

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität

München

**Untersuchung von Sensitivität und Spezifität eines Polymerase-  
Kettenreaktions-Schnelltests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund**

von

Ralph Selder

aus Friedberg

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 27.07.2018

Meiner Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT: DIAGNOSE DER KANINEN LEISHMANIOSE .....</b>	<b>2</b>
1.	Bedeutung von Hunden als Reservoir .....	2
2.	Nachweis von Leishmanien-Infektionen.....	4
2.1.	Indirekte Nachweisverfahren.....	5
2.1.1.	Nachweis von Antikörpern .....	6
2.1.1.1.	Labortests.....	8
2.1.1.1.1.	Immunofluorescence Assay .....	9
2.1.1.1.2.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	12
2.1.1.1.3.	Direkter Agglutinationstest.....	16
2.1.1.1.4.	Durchflusszytometrie.....	19
2.1.1.2.	Schnelltests .....	22
2.1.2.	Nachweis der zellulären Immunität .....	25
2.1.2.1.	Montenegro-Skin-Test .....	25
2.1.2.2.	Lymphozyten-Proliferationstest .....	26
2.2.	Direkte Nachweisverfahren .....	27
2.2.1.	Mikroskopische Untersuchung .....	27
2.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.2.2.1.	Labortests.....	31
2.2.2.2.	Schnelltests .....	36
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>48</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>54</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>58</b>

---

<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>78</b>
--------------	------------------------	-----------

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
%	Prozent
<i>B. canis</i>	<i>Babesia canis</i>
DAT	direkter Agglutinationstest
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
CLA	Crude <i>Leishmania</i> Antigen ( <i>Leishmania</i> -Rohantigen)
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAST	Fast Agglutination Screening Test (Schnellagglutinations-Screeningtest)
FML	Fucose-Mannose-Ligand
gp	Glykoprotein(e)
HE	Hämatoxilin-Eosin
ICPOC	In-Clinic Point-of-Care
IFA	Immunofluorescence Assay
IgG	Immunglobulin G
kDNA	kinetoplastic Desoxy-Ribonucleic Acid (kinetoplastische Desoxyribonukleinsäure)
<i>L. aethiopica</i>	<i>Leishmania aethiopica</i>
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification (Schleifen-vermittelte isothermale Amplifizierung)
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania</i> -Spezies

---

<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. lainsoni</i>	<i>Leishmania lainsoni</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<i>L. naiffiand</i>	<i>Leishmania naiffiand</i>
<i>L. panamanensis</i>	<i>Leishmania panamanensis</i>
<i>L. peruviana</i>	<i>Leishmania peruviana</i>
<i>L. pifanoi</i>	<i>Leishmania pifanoi</i>
<i>L. shawi</i>	<i>Leishmania shawi</i>
LST	Leishmanin-Skin-Test
<i>L. tropica</i>	<i>Leishmania tropica</i>
<i>L. venezuelensis</i>	<i>Leishmania venezuelensis</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MST	Montenegro-Skin-Test
nPCR	nested Polymerase Chain Reaction (ineinandergeschachtelte Polymerase-Kettenreaktion)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RPA	Rekombinase-Polymerase-Amplifizierung
SOP	Standard Operating Procedures (Standardarbeitsanweisungen)
spp.	Spezies
SYBR Green	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th	T-Helfer-Zelle
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)



z. B.

zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

Die kanine Leishmaniose, eine weltweit verbreitete Zoonose, gewinnt auch in Deutschland immer mehr an Bedeutung. Hierfür zuträglich ist der zunehmende Import von Hunden aus dem südlichen Ausland, jedoch ebenso die Tatsache, dass Hunde zur Urlaubszeit immer häufiger mit ins endemische Ausland reisen. Eine nicht zu unterschätzende Anzahl an Hunden kommt dort mit Protozoen des Genus *Leishmania* in Berührung. Desweiteren spielt im Rahmen der globalen Erwärmung die zunehmende nördliche Ausbreitung von Insekten der Gattung *Phlebotomus*, den bislang einzigen sicher nachgewiesenen Überträgern der Leishmaniose beim Hund, eine immer wichtiger werdende Rolle. Durch den Import von Hunden aus dem endemischen Ausland und der zunehmenden Ausbreitung des Lebensraums der *Phlebotomus* spp. sind mittlerweile auch autochthone Infektionen mit Erregern des Genus *Leishmania* in bislang nicht endemischen Regionen nicht mehr auszuschließen (MENN et al., 2010; MAIA et al., 2015).

Die Diagnose der Leishmaniose beim Hund stellt den Untersucher regelmäßig vor diagnostische Hürden. Auf der einen Seite werden indirekte Nachweisverfahren, wie Immunofluorescence Assays (IFA) oder Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), zum Nachweis spezifischer Antikörper verwendet. Der Zeitpunkt, ab dem eine Infektion mit dem Erreger mittels Antikörper-Nachweisverfahren bestätigt werden kann, ist jedoch variabel und schwankt zwischen vier Wochen (experimentelle Infektion) (MORENO & ALVAR, 2002), drei Monaten (natürliche Infektion) (QUINNELL et al., 2003) und drei Jahren (natürliche Infektion) (SOLANO-GALLEGO et al., 2005). Zudem ist davon auszugehen, dass einige sicher infizierte Hunde ein Leben lang keine nachweisbaren Antikörper bilden (SOLANO-GALLEGO et al., 2001a; LEONTIDES et al., 2002). Bei den direkten Nachweisverfahren steht heutzutage die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Vordergrund. Der direkte Erregernachweis mittels PCR kann jedoch nur in spezialisierten Labors durchgeführt werden. Schnelltests zum direkten Erregernachweis mittels PCR würden eine interessante Alternative darstellen, da sie direkt in der Praxis durchführbar wären. Diese Studie soll daher die Sensitivität und Spezifität eines PCR-Schnelltests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund ermitteln und Aussagen zu Praktikabilität und Brauchbarkeit im klinischen Alltag treffen.

## II. LITERATURÜBERSICHT:

### DIAGNOSE DER KANINEN LEISHMANIOSE

#### 1. Bedeutung von Hunden als Reservoir

In mehr als 80 Ländern sind Leishmanien, vertreten durch verschiedene *Leishmania*-Spezies (spp.), endemisch anzutreffen. Hierzu zählen Mittelmeerländer, aber auch Länder in Südamerika, Asien und Afrika. Jährlich treten beim Menschen weltweit etwa zwei Millionen Neuinfektionen auf, von denen die Hälfte Kinder betreffen (BHATTACHARYA et al., 2006). Weltweit sind mehr als zwölf Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert, von denen jährlich bis zu 40.000 an den Folgen der Leishmaniose versterben (ALVAR et al., 2012). Gemäß World Health Organization (WHO) wird die Leishmaniose als eine der fünf weltweit wichtigsten endemischen parasitären Infektionskrankheiten geführt und in Bezug auf die Sterberate lediglich von Malaria übertroffen. Rund 350 Millionen Menschen weltweit haben zudem ein hohes Risiko, mit Leishmanien infiziert zu werden und zu erkranken (BERN et al., 2008). Der Hund wird nach wie vor als wichtigstes Reservoir für die Übertragung von *Leishmania infantum* (*L. infantum*) und *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) angesehen (GRAMICCIA & GRADONI, 2005), und Schätzungen zur Folge sind allein im südeuropäischen Raum bis zu zweieinhalb Millionen Hunde mit Leishmanien infiziert (MORENO & ALVAR, 2002).

Der Mensch ist empfänglich für Infektionen durch eine große Anzahl an *Leishmania* spp. Dies muss bei der durchzuführenden Diagnostik Berücksichtigung finden. Dabei gibt es *Leishmania* spp., die für einen viszerotropen, einen kutanen und einen mukokutanen Krankheitsverlauf in Frage kommen (HERWALDT, 1999). Bei den kutanen und mukokutanen Leishmanioseformen können wiederum weitere Unterformen unterschieden werden. Die Abgrenzungen sind hierbei oft fließend (Tabelle 1). Die meisten der viszeralen Leishmaniosefälle werden beim Menschen durch *Leishmania donovani* (*L. donovani*) sowie *L. infantum* hervorgerufen. Jedoch kann auch jede andere *Leishmania* spp. (z. B. *Leishmania tropica* (*L. tropica*) und *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*)), die normalerweise eine kutane Leishmaniose hervorruft, potenziell eine viszerale Form auslösen und umgekehrt (HERWALDT, 1999; READY et al., 2014). Neben Infektionen durch *L. infantum* und *L. donovani* sind beim Mensch Infektionen

durch *L. tropica* (MAGILL et al., 1993; ALBORZI et al., 2006), *Leishmania major* (*L. major*) (DA SILVA et al., 1989), *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) (VELASCO et al., 1989), *L. amazonensis* (COSTA et al. 1986; GRIMALDI et al., 1989; LUCAS et al., 1998), *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) (COSTA et al., 1986; GRIMALDI et al., 1989; CARVALHO et al., 1994), *Leishmania aethiopica* (*L. aethiopica*) (AKUFFO et al., 1997; VAN GRIENSVEN et al., 2016), *Leishmania panamanensis* (*L. panamanensis*) (GRIMALDI et al., 1989; OSORIO et al., 1998; HASHIGUCHI et al., 2016), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*) (SANTRICH et al., 1990; COUPPIE et al., 2004; HASHIGUCHI et al., 2016), *Leishmania shawi* (*L. shawi*) (SHAW et al., 1991), *Leishmania lainsoni* (*L. lainsoni*), *Leishmania naiffiand* (*L. naiffiand*) (HASHIGUCHI et al., 2017), *Leishmania venezuelensis* (*L. venezuelensis*) (HERWALDT, 1999), *Leishmania peruviana* (*L. peruviana*) (HERWALDT, 1999) sowie *Leishmania pifanoi* (*L. pifanoi*) (CONVIT et al., 1972) beschrieben. Das Krankheitsbild und der Gewebstropismus richten sich dabei nach der jeweiligen *Leishmania* spp. (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Formen der Leishmaniose des Menschen mit den verantwortlichen *Leishmania*- (*L.*-) Spezies (HERWALDT, 1999; READY et al., 2014).

Viszerale Leishmaniose	Kutane Altwelt-Leishmaniose	Kutane Neuwelt-Leishmaniose	Mukosale Leishmaniose	Rezidivierende kutane Leishmaniose	Diffuse kutane Leishmaniose
<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i>	<i>L. chagasi</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamanensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamanensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. mexicana</i>

Im Rahmen der zunehmenden globalen Erwärmung erweitert sich der Lebensraum der Sandmücke in Europa nordwärts und reicht mittlerweile in Norditalien bis zu den Alpen (MAROLI et al., 2008) sowie in Frankreich und Spanien bis zu den Pyrenäen (AMUSATEGUI et al., 2004; CHAMAILLE et al., 2010), welche im Moment noch eine geographische Grenze darstellen. Jedoch nimmt durch den zunehmenden Import von Hunden aus dem endemischen Ausland sowie Reisen ins

endemische Ausland mit Hund die Anzahl von Leishmaniosefällen beim Hund auch in nicht endemischen Ländern, wie Großbritannien oder Deutschland, stetig zu (METTLER et al., 2005b; SHAW et al., 2009; MENN et al., 2010). Damit steigt das potenzielle Risiko für autochthone Infektionen. Klinisch erkrankte oder infizierte Hunde sind auch als potenzielles Problem der Volksgesundheit, auch in nicht endemischen Gebieten, von zunehmender Bedeutung (SHAW et al., 2009). Deshalb steigt, auch im Sinne der Volksgesundheit, der Bedarf an schnell durchführbaren und sicheren diagnostischen Tests zur Identifizierung einer Leishmanieninfektion beim Hund. Gerade schnell durchführbare Testmethoden, die sowohl der Diagnose einer *Leishmania*-spp.-Infektion, als auch einer Speziesidentifizierung dienen, sind dringend notwendig, genauso wie geeignete Therapie, Prophylaxe- und Kontrollmaßnahmen, die sicher, effektiv, bezahlbar und einfach durchführbar sind (HERWALDT, 1999). Eine große Anzahl an verschiedenen Testverfahren ist sowohl für den Menschen als auch für den Hund auf dem Markt erhältlich, jedoch sind nicht alle Testmethoden gleichermaßen zuverlässig und geeignet (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Bei der Wahl der Testmethode (direkter Erregernachweis oder indirekter Erregernachweis) muss der Infektionszeitpunkt mitberücksichtigt werden, um aussagekräftige Ergebnisse erwarten zu können (SOLANO-GALLEGO et al., 2001a; LEONTIDES et al., 2002; MORENO & ALVAR, 2002; QUINNELL et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2005).

## **2. Nachweis von Leishmanien-Infektionen**

Es gibt keine klinischen oder labordiagnostischen Veränderungen, die für eine *Leishmania*-spp.-Infektion beim Hund als pathognomonisch erachtet werden können. Die Leishmaniose beim Hund kann sehr unterschiedliche Verlaufsformen annehmen, von subklinischen Infektionen bis hin zu schwerwiegender klinischer Erkrankung mit tödlichem Ausgang (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Neben einer Vielzahl unspezifischer klinischer Auffälligkeiten (unter anderem generalisierte Lymphadenomegalie, Gewichtsverlust, verminderter Appetit, Apathie, blasse Schleimhäute, Splenomegalie, Polyurie/Polydipsie, Fieber, Erbrechen, Durchfall) und labordiagnostischer Abnormalitäten (unter anderem Hyperglobulinämie, Hypalbuminämie, erniedrigtes Albumin/Globulin-Verhältnis, geringgradige bis mittelgradige aregenerative Anämie, Leukozytose oder Leukopenie, Thrombozytopenie und/oder Thrombozytopathie, Proteinurie, renale

Azotämie, Erhöhung von Leberenzymaktivitäten) treten bei einer Leishmaniose häufig Hautveränderungen auf (SOLANO-GALLEG0 et al., 2011).

Dass eine Infektion jedoch nicht zwangsläufig mit einer klinischen Erkrankung einhergehen muss, spiegelt sich in einer hohen Anzahl an subklinisch infizierten Hunden wider (SOLANO-GALLEG0 et al., 2001a; BANETH et al., 2008). Bei begründetem Verdacht sind indirekte und direkte Erregernachweisverfahren notwendig, um eine Leishmaniose zu bestätigen oder gegebenenfalls auszuschließen (MAIA & CAMPINO, 2008).

Menschen sind für eine ganze Reihe von *Leishmania* spp. empfänglich, der Hund jedoch hauptsächlich für zwei Spezies. Im europäischen Mittelmeerraum sind Hunde ausschließlich mit *L. infantum* infiziert (MORENO & ALVAR, 2002; BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEG0 et al., 2011). In Süd- und Mittelamerika wird die Leishmaniose beim Hund hauptsächlich durch *L. chagasi* hervorgerufen (DANTAS-TORRES, 2007), wobei beide *Leishmania* spp. phylogenetisch eng miteinander verwandt sind (TUON et al., 2008). In Südamerika können Hunde zudem selten durch *L. braziliensis* infiziert werden (DANTAS-TORRES et al., 2017). In Nordafrika und dem Mittleren Osten sind bei Hunden neben *L.-infantum*-Infektionen vereinzelt auch Infektionen mit *L. major* (BANETH et al., 2016; BANETH et al., 2017) sowie *L. tropica* (GUESSOUS-IDRISSI et al., 1997; BANETH et al., 2014; BANETH et al., 2017) beschrieben. Für andere *Leishmania* spp. ist der Hund kaum empfänglich und spielt bei der möglichen Übertragung auf den Menschen eine untergeordnete Rolle (DANTAS-TORRES, 2007).

## **2.1. Indirekte Nachweisverfahren**

Einmal infizierte Hunde eliminieren Leishmanien nach einer Infektion vermutlich nie mehr (NOLI & AUXILIA, 2005). Deshalb hat der indirekte Erregernachweis für die Diagnose und Therapiekontrolle beim Hund eine deutlich größere Aussagekraft als in der humanmedizinischen Leishmaniosediagnostik. Beim Menschen können trotz erfolgreicher Therapie mit Erregerelimination indirekte Nachweisverfahren über einen relativ langen Zeitraum noch positiv ausfallen, was den Nutzen von indirekten Nachweisverfahren zur Therapiekontrolle stark einschränkt. Bei den indirekten Nachweismethoden wird zwischen Nachweisverfahren einer humoralen und zellvermittelten Immunantwort

unterschieden. Es muss berücksichtigt werden, dass der indirekte Erregernachweis nicht die tatsächliche Anwesenheit von Leishmanien detektiert, sondern die Immunreaktion, die im betroffenen Wirt ausgelöst wird (MAIA & CAMPINO, 2008).

### 2.1.1. Nachweis von Antikörpern

Beim Antikörpernachweis werden antigenspezifische Antikörper detektiert. Selten kann auch eine Antikörperkreuzreaktion auf Trypanosomen zu einem positiven Ergebnis führen. Dies tritt vor allem dann auf, wenn *Leishmania*-Rohantigene eingesetzt werden (PORROZZI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

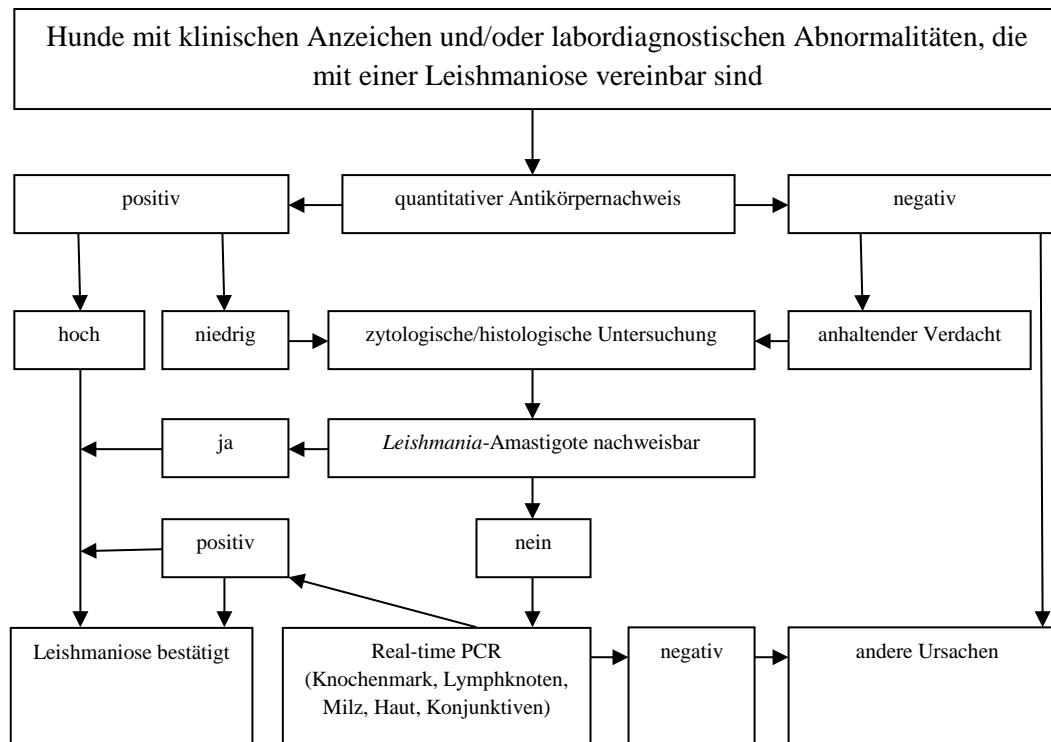
Die Prävalenz von subklinisch infizierten Hunden in endemischen Regionen ist häufig deutlich höher als die Antikörperprävalenz und die Prävalenz der Erkrankung (BANETH et al., 2008). Bei Hunden, die im Antikörpertest negativ sind, kann daher eine Leishmaniose nicht sicher ausgeschlossen werden. In Studien, in denen Hunde experimentell mit Leishmanien infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass es zwischen einem Monat und drei Jahren dauern kann, bis ein Hund nach Infektion nachweisbare Antikörper bildet (MORENO & ALVAR, 2002). Bei natürlichen Infektionen dauert es in der Regel drei Monate, bis mit der Nachweisbarkeit von Antikörpern gerechnet werden kann (QUINNELL et al., 2003). Bei manchen Hunden dauert dies jedoch bis zu drei Jahren (SOLANO-GALLEGO et al., 2005). Darüber hinaus gibt es infizierte Hunde, die lebenslang keine spezifischen Antikörper bilden. Dies wird durch Studien untermauert, in denen gezeigt wurde, dass in endemischen Gebieten bei 63,0 % der untersuchten Hunde eine Leishmanieninfektion mittels direktem Erregernachweis (Polymerase-Kettenreaktion (PCR)) bestätigt werden konnte, wohingegen der Antikörpernachweis bei nur 12–13 % der untersuchten Hunde positiv war (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; LEONTIDES et al., 2002). Bei subklinisch infizierten Hunden, deren Immunantwort vorwiegend zellulär (T-Helfer-Zelle- (Th-) 1-Immunantwort) statt humoral (Th-2-Immunantwort) ausfällt, sind häufig keine Antikörper nachweisbar (BARBIERI, 2006).

In den letzten Jahren wurden Leishmaniose-Impfstoffe für Hunde auf dem brasilianischen und europäischen Markt verfügbar. Die meisten der Antikörpernachweisenden Tests (Immunofluorescence Assay (IFA), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)) können nicht zwischen Impfantikörpern

(Impfstoffe basierend auf *L.-infantum*- und *L.-donovani*-Proteinen), und Infektionsantikörpern unterscheiden (SOLANO-GALLEGO et al., 2017). Die Etablierung eines neuen Leishmaniose-Impfstoffs für den Hund, basierend auf dem Q-Protein, einem rekombinanten Protein bestehend aus fünf Fragmenten eines intrazellulären *L.-infantum*-Proteins, erwies sich als geeignet, um mit den gängigen antikörpernachweisenden Methoden zwischen Impf- und Infektionsantikörpern unterscheiden zu können (CARCELEN et al., 2009). Der Impfstoff aus rekombinantem Protein Q aus Fragmenten von *L. infantum* (*L. infantum* MON-1), Letifend® (Laboratorios Leti, Spain), ist seit April 2016 auch auf dem europäischen Markt erhältlich.

Zum Antikörpernachweis werden Verfahren zum qualitativen sowie quantitativen Nachweis unterschieden. Die gemessene Antikörperkonzentration kann zusammen mit klinischen und labordiagnostischen Auffälligkeiten herangezogen werden, um eine Einteilung in Infektionsstadien vorzunehmen (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Hohe Antikörperkonzentrationen mit entsprechenden klinischen Symptomen gelten als beweisend für eine klinisch manifeste Leishmaniose (Abbildung 1) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2014).





**Abbildung 1:** Empfehlung für das diagnostische Vorgehen bei Hunden mit Leishmanioseverdacht (modifiziert nach SOLANO-GALLEGO et al., 2011 („LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis.“)). PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Der Originalartikel liegt im Open-Access vor und wird unter den Bedingungen der Creative-Commons-Attribution-Lizenz zur Verfügung gestellt.

(<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)

### 2.1.1.1. Labortests

Zum Antikörpernachweis werden heutzutage vorwiegend der IFA und ebenso der ELISA zur Leishmaniosediagnostik eingesetzt. Sie finden sowohl bei Screeninguntersuchungen in endemischen Gebieten als auch zur individuellen Leishmaniosediagnostik Anwendung (MAIA et al., 2009; ARRUDA et al., 2016). Darüber hinaus werden die Durchflusszytometrie und der direkte Agglutinationstest (DAT), sowie Counterimmunoelektrophorese (BARBOSA et al., 1973), Immunodiffusionsassays (BERNADINA et al., 1997) oder der Western Blot (FERROGLIO et al., 2007) zum Antikörpernachweis eingesetzt. Diese Methoden finden jedoch keine routinemäßige Anwendung und werden hauptsächlich für experimentelle Studien eingesetzt (MAIA & CAMPINO, 2008).

### **2.1.1.1.1. Immunofluorescence Assay**

Das Prinzip des IFA beruht auf dem Nachweis von Antikörpern mittels Fluoreszenzreaktion. Als Antigene werden meist Lysate des ganzen Parasiten verwendet. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Im darauffolgenden Schritt werden die spezifischen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern sichtbar gemacht (indirekte Immunfluoreszenz). Folglich können unter dem Fluoreszenzmikroskop die gebundenen Antikörper detektiert werden. Ein Signalunterschied lässt hierbei positive von negativen Proben unterscheiden. Zur Quantifizierung der Antikörper müssen von der jeweiligen Serumprobe Verdünnungsreihen angefertigt werden. Die Verdünnungsstufe, bei der die Farbreaktion unter dem Mikroskop noch nachgewiesen werden kann, bestimmt den Antikörper-Titer (PALTRINIERI et al., 2010). Der cut-off-Titer zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Ergebnissen variiert von Labor zu Labor und liegt in der Regel zwischen 1:40 und 1:160 (FERROGLIO & VITALE, 2006).

Der IFA wurde in der Literatur mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten beschrieben und galt traditionell als „Goldstandard“ der antikörpernachweisenden Tests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund (ZAFFARONI et al., 1999). Von einigen Autoren wird er immer noch als Referenzdiagnostikmethode für Labors beschrieben (PALTRINIERI et al., 2010). Der hohe Arbeitsaufwand, die subjektive quantitative Befundinterpretation sowie die Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchenden schmälern jedoch die Praktikabilität dieser Methode (SWETS, 1988; MAIA & CAMPINO, 2008). Darüber hinaus variieren die Sensitivitäten und Spezifitäten dieser Methode von Studie zu Studie stark, weswegen die Bezeichnung als diagnostischer „Goldstandard“ überdacht werden muss (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013) (Tabelle 2). Trotzdem nimmt der IFA, gerade in endemischen Gebieten, nach wie vor einen hohen Stellenwert ein. Bei staatlichen Überwachungs- und Kontrollprogrammen wird meist auf diese Art des indirekten Erregernachweises zurückgegriffen, um infizierte Hunde zu identifizieren (ARRUDA et al., 2016). Der IFA wird auch für epidemiologische Studien sowie in der klinischen Praxis für das Therapiemonitoring eingesetzt. Die Sensitivität des IFA wird mit Werten bis zu 100 % beschrieben (MANCIANTI & MECIANI, 1988; CIAMARELLA et al., 1997; SILVA et al., 2006). Bei klinisch erkrankten Tieren erwies sich der IFA als sehr sensibler (90,0 % Sensitivität) und spezifischer (100 %

Spezifität) Test (Bestätigung der Infektion durch Kultur und/oder PCR von Lymphknotenaspiraten). Bei asymptomatischen Tieren fiel die Sensitivität mit nur 29,4 % jedoch deutlich geringer aus (METTLER et al., 2005a). Dies bestätigte sich im direkten Vergleich der Ergebnisse von IFA und Knochenmarks-PCR bei klinisch gesunden Hunden in endemischen Gebieten (LEONTIDES et al., 2002). In dieser Studie wurden vom IFA lediglich 12,3 % der untersuchten Tiere als positiv erkannt, während die PCR 63,0 % der untersuchten Tiere als infiziert diagnostizierte. Eine aktuelle Studie (ADEL et al., 2016), die sich mit dem systematischen Rückblick auf 31 Validierungsstudien zu unterschiedlichen IFA beschäftigte, beschrieb Sensitivitäten zwischen 31,5 % (asymptomatische Hunde) und 89,9 % (symptomatische Hunde) sowie Spezifitäten zwischen 96,6 % (endemische Gebiete) und 98,1 % (nicht-endemische Gebiete).

Kreuzreaktionen mit anderen Infektionserregern (*T. cruzi*) sind beschrieben (FERREIRA EDE et al., 2007). Hierdurch kann in endemischen Gebieten die Spezifität des IFA deutlich eingeschränkt werden (Spezifität 52,0 %, Sensitivität 72,0 %, gemessen an den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung von gefärbten Knochenmarks- und Hautbiopsien).

Zur Unterscheidung von Infektions- und Impfantikörpern (Impfstoffe basierend auf gereinigten sekretorischen und exkretorischen *L. infantum*-Proteinen (CaniLeish®, Virbac Santé Animale, France) sowie basierend auf dem Fucose-Mannose-Liganden (FML) und Oberflächenproteinen von *L. donovani* (Leishmune®, Zoetis, Brazil)) ist der IFA nicht geeignet, da hier nicht zwischen Impf- und Infektions-Antikörpern unterschieden werden kann (MARCONDES et al., 2013; MARTIN et al., 2014; MORENO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Lediglich bei einem Leishmanioseimpfstoff für Hunde, basierend auf dem rekombinanten Protein Q (Letifend®, Laboratorios Leti, Spain), kann mittels IFA zwischen einer vorherigen Impfung und einer Infektion unterschieden werden (CARCELEN et al., 2009).

**Tabelle 2:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten verschiedener Immunofluorescence Assays (IFA).

Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Sensitivität	Spezifität	Cut-off- Titer	Literatur
k. A.	Mikroskopie, Kultur, PCR (Knochenmark)	103	100 %	74,0 %	1:20	SILVA et al., 2006
<i>L. major</i>	Mikroskopie, Kultur, Immunhistochemie	1425	90,8 %	53,4 %	≥ 1:40	ARRUDA et al., 2016
<i>L. infantum</i>	Mikroskopie, Kultur	88	100 %	100 %	1:80	MANCIANTI & MECIANI, 1988
k. A.	PCR (Knochenmark, Blut)	644	21,6 %	k. A.	1:40	SILVA et al., 2001
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskopie (Knochenmark, Lymphknoten)	150	100 %	k. A.	1:80	CIAMARELLA et al., 1997
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Kultur +/- PCR (Lymphknoten)	171	29,4–90,0 %	100 %	≥ 1:40	METTLER et al., 2005a
<i>L. infantum</i>	Kultur/Mikroskopie (Knochenmark, Haut)	234	72,0 %	52,0 %	1:40	FERREIRA EDE et al., 2007
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR + ELISA (Blut)	60	65,0 %	94,0 %	≥ 1:80	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, k. A. = keine Angabe, *L.* = *Leishmania*,

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

### 2.1.1.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Prinzip des ELISA beruht auf dem Antikörpernachweis mittels enzymatischer Farbreaktion. Hierbei ist die Signalstärke des enzymkatalysierten Farbumschlags abhängig von der vorliegenden Antikörperkonzentration. Das Ergebnis ergibt sich aus dem Wert der optischen Dichte (MAIA & CAMPINO, 2008). Für den ELISA können verschiedene Antigene verwendet werden. Es werden ganze *Leishmania*-Amastigote (oder deren löslicher Bestandteile), ganze *Leishmania*-Promastigote (oder deren löslicher Bestandteile), rekombinate Proteine und aufgereinigte Proteine unterschieden (SOLANO-GALLEGU et al., 2014). Hierbei gibt es eine große Anzahl an unterschiedlichen Antigen-Aufbereitungen, die spezifisch anti-*Leishmania*-Antikörper nachweisen können und für den ELISA geeignet sind (MAIA & CAMPINO, 2008).

Abhängig davon, welches Antigen verwendet wird, können die Spezifitäten und Sensitivitäten stark variieren (Tabelle 3) (METTLER et al., 2005a; MAIA & CAMPINO, 2008). Heutzutage werden für ELISA hauptsächlich rekombinante Antigene verwendet (MAIA & CAMPINO, 2008). Diese werden mit Hilfe molekularbiologischer Techniken künstlich hergestellt und stellen immunologisch wirksame *Leishmania*-spp.-Proteine dar. Das Protein rK39, ein repetitives, immundominantes Epitop eines Kinesin-assoziierten Proteins wurde in der Tiermedizin bereits häufig eingesetzt und zeigte bei rK39-basierten ELISA bei natürlich infizierten, symptomatischen Hunden eine hohe Sensitivität (96,6 %) und Spezifität (99,2 %) (SCALONE et al., 2002). Bei asymptomatischen Tieren zeigte sich beim rK39-ELISA mit 66,0 % eine deutlich niedrigere Sensitivität (PORROZZI et al., 2007). ELISA, basierend auf anderen rekombinanten Antigenen, wie z. B. rK9, rK26 oder HSP70, hatten sehr unterschiedliche Sensitivitäten (44,0–100 %) bei durchwegs hohen Spezifitäten (85,0–100 %) (Tabelle 3).

Sofern *Leishmania*-spp.-Rohantigen (CLA) von promastigoten oder amastigoten Parasitenstadien zum Einsatz kam, lag die Sensitivität bei symptomatischen Hunden bei Werten zwischen 89,2 % und 100 %. Bei asymptomatischen Tieren lag die Sensitivität je nach Studie bei Werten zwischen 30,0 % und 100 % (METTLER et al., 2005a; PORROZZI et al., 2007; SANTAREM et al., 2010). Die Spezifität des ELISA wird abhängig von der Studie mit Werten zwischen 64,0 % und 100 % angegeben (METTLER et al., 2005a; FERREIRA EDE et al., 2007; PORROZZI et

al., 2007; SANTAREM et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von CLA-*Leishmania*-Amastigoten (82,4–90,4 % Sensitivität) im Vergleich zu *Leishmania*-Promastigoten (73,7–89,2 % Sensitivität) als eingesetztes Antigen für den ELISA, sowohl bei klinisch kranken als auch subklinisch infizierten Hunden, bessere Sensitivitäten erreicht werden konnten (SANTAREM et al., 2010). Die Spezifität war mit 91,7 % identisch.

Dot-ELISA mit Peroxidase-markiertem Protein A weisen im Gegensatz zu konventionellen ELISA Vorteile im technischen Arbeitsablauf auf, da diese einfach und schnell durchzuführen sind und trotzdem gute Resultate bezüglich Sensitivität und Spezifität hervorbringen. Gemessen am direkten Erregernachweis mittels mikroskopischer parasitologischer Untersuchung wies der Dot-ELISA eine Spezifität von 100 % und, abhängig vom gewählten cut-off-Wert, eine Sensitivität zwischen 90,0 % und 100 % auf (FISA et al., 1997).

Ebenso wie beim IFA, ist es auch beim ELISA nicht möglich, Impfantikörper (Leishmune<sup>®</sup>, CaniLeish<sup>®</sup>) von Infektionsantikörpern zu unterscheiden. Auch hier stellt der Impfstoff Letifend<sup>®</sup>, basierend auf dem rekombinanten Antigen Protein Q, eine Ausnahme dar. Bei einer vorherigen Impfung mit diesem Impfstoff kann der ELISA zwischen vorheriger Impfung und Infektion differenzieren (MORENO et al., 2012; MARCONDES et al., 2013; MARTIN et al., 2014; MORENO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

**Tabelle 3:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) mit verschiedenen Antigenen.

Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Sensitivität	Spezifität	Literatur
rLdA2	IFA/Mikroskopie	78	87,0 %	100 %	CARVALHO et al., 2002
rLiP0	IFA	32	78,0 %	k. A.	SOTO et al., 1995b
rLiP2a, b	IFA	26	80,0 %	100 %	SOTO et al., 1995a
rHSp83	IFA	42	88,0 %	k. A.	ANGEL et al., 1996
LI gp63	IFA	36	100 %	k. A.	MORALES et al., 1997
LiP2a-rLiP2b-rLiP0-rH2a (FAST)	IFA	26	79,0–93,0 %	96–100 %	SOTO et al., 1998
HSP70, KMP-11	Mikroskopie (Lnn.)	7	100 %	k. A.	NIETO et al., 1999
rLiH2a, rLiH2b, rLiH3, rLiH4 (FAST)	IFA/Mikroskopie (Lnn.)	61	44,0–72,0 %	k. A.	SOTO et al., 1999
rK9	IFA/ Mikroskopie (Lnn.)	249	95,0 %	100 %	ROSATI et al., 2003
rK26	IFA/ Mikroskopie (Lnn.)	249	99,1–100 %	96–100 %	ROSATI et al., 2003
rK39	IFA/ Mikroskopie (Lnn.)	249	95,0 %	100 %	ROSATI et al., 2003
<i>Lim</i> TXNPx	DAT/Mikroskopie	250	49,1–66,3 %	90,1 %	SANTAREM et al., 2010
rK39	DAT/Mikroskopie	250	56,1–88,0 %	92,7 %	SANTAREM et al., 2010

Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<i>L. infantum</i> (Amastigote)	DAT/Mikroskopie	250	82,4–90,4 %	91,7 %	SANTAREM et al., 2010
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	DAT/Mikroskopie	250	73,7–89,2 %	91,7 %	SANTAREM et al., 2010
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskope (Lnn.)	127	90,0–100 %	100 %	FISA et al., 1997
<i>L. donovani</i> -Komplex	Kultur/Mikroskopie (KM, Haut)	234	95,0 %	64,0 %	FERREIRA EDE et al., 2007
rK26	Mikroskopie (KM, Lnn.)	139	66,0–94,0 %	90,0 %	PORROZZI et al., 2007
rK39	Mikroskopie (KM, Lnn.)	139	66,0–100 %	85,0 %	PORROZZI et al., 2007
A2	Mikroskopie (KM, Lnn.)	139	70,0–88,0 %	96,0 %	PORROZZI et al., 2007
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskopie (KM, Lnn.)	139	30,0–88,0 %	87,0 %	PORROZZI et al., 2007
rK39	Kultur +/- PCR (Lnn.)	171	52,0–64,0 %	96,0–100 %	METTLER et al., 2005a
<i>L. infantum</i> (Amastigote)	Kultur +/- PCR (Lnn.)	171	82,4–100 %	98,0–100 %	METTLER et al., 2005a
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Kultur +/- PCR (Lnn.)	171	33,3–100 %	96,0–100 %	METTLER et al., 2005a
rK39	IFA/Mikroskopie	442	92,4–96,6 %	99,1–99,2 %	SCALONE et al., 2002

DAT = Direkter Agglutinationstest, IFA = Immunofluorescence Assay, k. A. = keine Angabe, KM = Knochenmark, *L.* = *Leishmania*, Lnn. = Lymphknoten



### 2.1.1.1.3. Direkter Agglutinationstest

Für die Durchführung des DAT können zum Antikörpernachweis ganze gefärbte promastigote Leishmanien, entweder in Suspension oder gefriergetrocknet, verwendet werden. Leishmanien-infizierte Patienten bilden Antikörper, die gegen die Oberflächenantigene der Leishmanien gerichtet sind. Der DAT erkennt diese spezifischen Antikörper im Blut des Patienten. Eine direkte Agglutination auf der Testplatte, die mit den Antigenen beschichtet ist, ist die Folge. In Abwesenheit von *Leishmania*-spp.-Antikörpern akkumuliert das DAT-Antigen am Boden der Testplatte und stellt sich als dunkelblauer Punkt dar. Wenn in der zu untersuchenden Probe anti-*Leishmania*-spp.-Antikörper vorliegen, bildet das Antigen einen flächig hellblauen Film (ADAMS et al., 2012). Als Untersuchungsmaterial eignen sich sowohl Plasma als auch Serum (MAIA & CAMPINO, 2008). Um das Ergebnis des DAT zu quantifizieren, werden Verdünnungsreihen des eingesetzten Materials angelegt.

In endemischen Gebieten zeigte der DAT Sensitivitäten zwischen 70,6 % (MOHEBALI et al., 2004) und 100 % (SILVA et al., 2006) und Spezifitäten zwischen 84,9 % (MOHEBALI et al., 2004) und 100 % (NEOGY et al., 1992). Die lange Probeninkubationszeit und die seriellen Verdünnungen der Serumproben, die die Praktikabilität des DAT einschränken, wurde durch die Entwicklung von „Fast Agglutination Screening Tests“ (FAST) mit höherer Parasitenkonzentration, einem niedrigeren Testvolumen, einer deutlich reduzierten Inkubationszeit sowie der Notwendigkeit einer einzigen Serumverdünnung deutlich verbessert. Hierbei wurden Sensitivitäten zwischen 93,6 % und 97,7 % sowie Spezifitäten zwischen 89,0 % und 93,0 % erreicht (SCHALLIG et al., 2002; SCHALLIG et al., 2004).

Trotz der beschriebenen hohen Sensitivitäten und Spezifitäten (Tabelle 4) nimmt der DAT zur Testdurchführung sehr viel Zeit in Anspruch und eignet sich nicht für Screeninguntersuchungen, wenn eine größere Anzahl an Proben untersucht werden muss. Allein die Inkubation der Proben dauert 18 Stunden. Deshalb findet er heutzutage in der Leishmaniose-Routinediagnostik kaum mehr Anwendung (SCHALLIG et al., 2002). Der FAST hingegen, der die Vorteile der schnellen Verfügbarkeit von Ergebnissen innerhalb von vier Stunden, einfacher Ergebnisinterpretation, niedrigen Durchführungskosten (unter 0,5 US \$/Probendurchführung) und deutlich vereinfachtem Arbeitsaufwand (keine seriellen Verdünnungen notwendig) vereint, findet gerade bei

Screeninguntersuchungen im Rahmen von Kontrollprogrammen in endemischen Gebieten oder zum Screening von Blutkonserven für Transfusionszwecke beim Hund Verwendung (SCHALLIG et al., 2002).

Im Gegensatz zum IFA und ELISA können sowohl DAT als auch FAST nach Verwendung eines Leishmanioseimpfstoffs, basierend auf FML und Oberflächenantigenen von *L. donovani* (Leishmune<sup>®</sup>, Zoetis, Brazil), zwischen Infektions- und Impfantikörpern unterscheiden (RIBEIRO et al., 2015). Ob dies auch für Impfstoffe, die auf exkretorischen und sekretorischen *L. infantum*-Proteinen oder rekombinanten Antigenen (Protein Q) basieren, gilt, ist unklar, da es hierzu bislang keine Studien gibt.

**Tabelle 4:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten des direkten Agglutinationstests (DAT) und des Schnellagglutinations-Screeningtests (FAST).

Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Sensitivität	Spezifität	Cut-off-Titer	Literatur
<i>L. infantum</i> LON-49	Mikroskopie, Kultur, Versuchstierinokulation	268	70,6 %	84,9 %	$\geq 1:320$	MOHEBALI et al., 2004
<i>L. donovani</i> -Antigen	Mikroskopie, Kultur, PCR (Knochenmark)	103	100 %	91,0 %	$> 1:400$	SILVA et al., 2006
k. A.	Mikroskopie	113	95,5 %	100 %	$> 1:400$	NEOGY et al., 1992
<i>L. donovani</i> MHOM/SD/68/1S	Mikroskopie	170	93,6 %	89,0 %	$> 1:400$	SCHALLIG et al., 2002 (FAST)
<i>L. donovani</i> MHOM/SD/68/1S	Mikroskopie	170	88,6 %	96,7 %	$> 1:400$	SCHALLIG et al., 2002 (DAT)
<i>L. donovani</i> -Antigen	Mikroskopie, IFA	206	97,7 %	93,0 %	$> 1:400$	SCHALLIG et al., 2004 (FAST)
<i>L. donovani</i> -Antigen	Mikroskopie, IFA	206	97,7 %	95,2 %	$> 1:400$	SCHALLIG et al., 2004 (DAT)
<i>L. donovani</i> - Antigen	Kultur/Mikroskopie (Knochenmark, Haut)	234	93,0 %	95,0 %	$> 1:400$	FERREIRA EDE et al., 2007

DAT = direkter Agglutinationstest, FAST = Fast Agglutination Screening Test, IFA = Immunfluorescence Assay, k. A. = keine Angabe, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.1.1.1.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches anhand von optischen und elektronischen Signalen die Zählung, Untersuchung und das Sortieren von mikroskopischen Partikeln, die in einem Flüssigkeitsstrom gelöst vorhanden sind, ermöglicht. Bei der Antikörper-Durchflusszytometrie werden spezifische Antikörper gegen gebundene *Leishmania*-spp.-Antigene detektiert (MAIA & CAMPINO, 2008). Hierbei werden eine aufbereitete *Leishmania*-spp.-Antigen-Suspension zusammen mit verdünntem Patientenserum in einer Mikrotitrierplatte inkubiert. Mehrere Waschschrte folgen, bevor fluoreszenzmarkierte anti-canine-Immunglobulin-G- (IgG-)Antikörper hinzugefügt werden und eine weitere Inkubation stattfindet. Nach weiteren Waschschrten kann das Ergebnis abgelesen werden. Positive Proben erscheinen fluoreszent, während negative Proben keine Fluoreszenz aufweisen. Bereits seit 2002 wird die Antikörper-Durchflusszytometrie zur Leishmaniosediagnostik in der Humanmedizin genutzt (ROCHA et al., 2002). Ein tiermedizinischer Durchflusszytometrie-Prototyp zum Nachweis von anti-*Leishmania*-spp.-IgG-Antikörpern bei mit *L. infantum*-infizierten Hunden erwies sich als sehr sensitiv und spezifisch (100 % Sensitivität, 100 % Spezifität) (KER et al., 2013). Die Spezifität dieses Tests sank jedoch durch den Einschluss von Hunden, die mit anderen Erregern infiziert waren, teilweise deutlich ab (*L. braziliensis* 80,0 %, *T. cruzi* 55,6 %, *Babesia (B.) canis* 100 %, *Ehrlichia (E.) canis* 93,3 %). Eine Studie (DE ANDRADE et al., 2007) zeigte, dass sich dieser indirekte Erregernachweis zur Detektion von Antikörpern gegen fixierte Antigene (*L. chagasi*-Promastigote) im Serum von mit *L. chagasi* infizierten Hunden eignet, um zwischen vorangegangener Impfung und Infektion zu unterscheiden. Hierbei wird von den Autoren postuliert, dass durch den Nachweis der Antikörper FC-AFPA-IgG und FC-AFPA-IgG2 eine derartige Unterscheidung möglich ist (IgG: Sensitivität 97,0 %, Spezifität 100 %; IgG2: Sensitivität 93,0 %, Spezifität 100 %). Eine weiterentwickelte Form der Durchflusszytometrie, basierend auf der Inklusion von Fluoreszenzimmunosensoren, die magnetische Polymersphären, ausgekleidet mit rekombinanten Antigenen (rK39 und *LicTXNPx*), zum Nachweis von spezifischen Antikörpern verwenden, zeigte sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen Hunden sehr gute Ergebnisse (98,8 % Sensitivität, 94,4 % Spezifität) (SOUSA et al., 2013).

Trotz der guten Sensitivitäten und Spezifitäten dieser Methode (Tabelle 5) findet die Durchflusszytometrie wegen der hohen technischen Ansprüche bislang ausschließlich in experimentellen Studien Verwendung (DE ANDRADE et al., 2007).

**Tabelle 5:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten der Antikörper-Durchflusszytometrie im Rahmen der Leishmaniose-Diagnostik beim Hund.

Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskopie, Kultur	278	100 %	100 %	KER et al., 2013
<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskopie/IFA	65	93,0–97,0 %	100 %	ANDRADE et al., 2007
rK39, <i>L. ic</i> TNXPx	Mikroskopie/DAT/PCR	129	94,4–98,8 %	94,4 %	SOUSA et al., 2013

DAT = Direkter Agglutinationstest, IFA = Immunofluorescence Assay, *L.* = *Leishmania*,  
PCR = Polymerase-Kettenreaktion

### 2.1.1.2. Schnelltests

Für den Antikörpernachweis beim Hund gibt es eine große Anzahl an Schnelltests, die eine mögliche *Leishmania*-spp.-Infektion nachweisen sollen. Manche dieser antikörpernachweisenden Schnelltests können aufgrund der im Schnelltest verwendeten Antigene zwischen einer Infektion und einer vorangegangenen Leishmaniose-Impfung unterscheiden. Ganzzellbasierte Tests sind hierzu generell nicht in der Lage (Tabelle 6). Einige dieser Schnelltests sind ELISA, andere Schnelltests basieren auf dem eines ELISA ähnlichen Prinzips, der Immunochromatographie, und wiederum andere sind in-house-IFA (Tabelle 6). Neben ganzzellbasierten Antigenen werden auch für die Schnelltests häufig rekombinate Proteine eingesetzt (REITHINGER et al., 2002; DA COSTA et al., 2003; FERROGLIO et al., 2013). Bei natürlich infizierten Hunden konnten mithilfe dieser antikörpernachweisenden Schnelltests Spezifitäten zwischen 89,6 % und 100 % und Sensitivitäten zwischen 63,6 % und 95,3 % ermittelt werden (SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Bei experimentell infizierten Hunden lag die Spezifität zwischen 94,0 % und 100 %, die Sensitivität zwischen 65,0 % und 98,0 % (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013).

Immunochromatographische Schnelltests wie der Speed Leish K<sup>®</sup> haben zwar den Vorteil, dass sie einfach durchzuführen und zu interpretieren sind, sie liefern jedoch ausschließlich qualitative Ergebnisse. Sofern der qualitative Nachweis negativ ausfällt, sollten weitere Tests folgen, da die Sensitivität dieser qualitativen Antikörper-Schnelltests (Speed Leish K<sup>®</sup>: 63,6 % Sensitivität) relativ niedrig ist (METTLER et al., 2005a; SOLANO-GALLEGO et al., 2014).

**Tabelle 6:** Antikörpernachweisende Schnelltests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund mit den zugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten.

Methoden	Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Unterscheidung Impfung/Erkrankung	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<b>ELISA-Schnelltest</b>							
ID Screen®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	IFA	1064	Nein	98,5 %	99,2–100 %	POURQUIER et al., 2007
ID Screen®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Quantitativer ELISA	203	Nein	95,3 %	100 %	SOLANO-GALLEGO et al., 2014
Leiscan®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Quantitativer ELISA	203	Nein	92,5 %	100 %	SOLANO-GALLEGO et al., 2014
Leishmania 96®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Quantitativer ELISA	203	Nein	92,5 %	89,6 %	SOLANO-GALLEGO et al., 2014
Leishmania 96®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	IFA	227	Nein	88,9 %	78,2 %	BOARINO et al., 2008
Leiscan®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	98,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
INGEZIM® LEISHMANIA	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	78,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
INGEZIM® LEISHMANIA VET	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	76,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
Snap® CLATK	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	IFA+ Western Blot	234	Nein	91,1–93,4 %	98,3–99,2 %	FERROGLIO et al., 2007
SNAP® Canine Leishmania Antibody Test Kit	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Mikroskopie, ELISA, IFA	400	Nein	94,7 %	90,6 %	MARCONDES et al., 2011



Methode	Antigen	Referenzmethode	Tierzahl (Hunde)	Unterscheidung Impfung/Erkrankung	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<b>Immunochromatographischer Schnelltest</b>							
Speed Leish K®	Rekombinantes Kinesin	Quantitativer ELISA	203	Ja	63,6 %	100 %	SOLANO-GALLEGO et al., 2014
Speed Leish K®	Rekombinantes Kinesin		250	Ja	96,3 %	100 %	FERROGLIO et al., 2013
INGEZIM®	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	75,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
LEISHMACHROM							
Snap® Leishmania	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	66,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
WITNESS® Leishmania	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	58,0 %	100 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013
RAPYDTEST	rK39	PCR (Blut) + ELISA	148	Nein	72,0–77,0 %	61–75 %	REITHINGER et al., 2002
<b>In-house-IFA</b>							
IFAT	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	Quantitativer ELISA	203	Nein	86,0 %	91,7 %	SOLANO-GALLEGO et al., 2014
IFAT	<i>L. infantum</i> (Promastigote)	PCR (Blut) + ELISA	60	Nein	65,0 %	94,0 %	RODRIGUEZ-CORTES et al., 2013

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IFA = Immunofluorescence Assay, *L.* = *Leishmania*, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

### 2.1.2. Nachweis der zellulären Immunität

Eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort ist die Grundlage eines Schutzes gegen die Ausbildung einer Krankheit nach Infektion (CABRAL et al., 1992; PINELLI et al., 1994). Methoden zur Untersuchung der zellulären Immunantwort im Rahmen der Leishmaniosediagnostik beim Hund werden seltener angewandt und sind weniger standardisiert im Vergleich zu den Methoden des Antikörpernachweises (MAIA & CAMPINO, 2008). Jedoch kann die Evaluation der spezifischen zellulären Immunantwort gegenüber *Leishmania* spp. einen entscheidenden Hinweis auf die Art der Immunantwort und somit die Prognose des betroffenen Hundes geben. So ist eine Th-1-Immunantwort (zellvermittelt) mit einer effektiven Kontrolle der Leishmanien durch den Organismus korreliert, was sich positiv auf die Prognose des Hundes auswirkt (FERNANDEZ-BELLON et al., 2005). Zum Nachweis der zellulären Immunität werden in der Veterinärmedizin der Montenegro-Skin-Test (MST) und der Lymphozyten-Proliferationstest angewandt (MAIA & CAMPINO, 2008).

#### 2.1.2.1. Montenegro-Skin-Test

Der MST, auch Leishmanin-Skin-Test (LST) genannt, ist der älteste Test in der Leishmaniosediagnostik. Sein Vorteil liegt in der einfachen Testdurchführbarkeit und in den geringen Kosten. Er beruht auf einer Überempfindlichkeitsreaktion vom späten Typ (delayed-type hypersensitivity reaction) nach intradermaler Applikation eines *Leishmania*-spp.-Antigens. Hierzu werden dem Hund verdünnte, inaktivierte promastigote Leishmanienstadien, das sogenannte „Leishmanin“, in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$ /Milliliter (ml) oder  $3 \times 10^8$ /ml in die Haut injiziert. Wenn sich 48 beziehungsweise 72 Stunden nach Applikation an der Injektionsstelle eine Schwellung bildet, die im Durchmesser mindestens 5 Millimeter (mm) beträgt, wird der Test als positiv gewertet (PINELLI et al., 1994; CARDOSO et al., 1998; SOLANO-GALLEG0 et al., 2001b). Genauso wie in der Humanmedizin beschrieben, fällt der Test bei symptomatischen Hunden meist negativ aus. Bei infizierten, aber asymptomatischen Hunden sowie bei erst seit kurzer Zeit infizierten Hunden oder Hunden, die zuvor therapiert wurden, ist der Test in der Regel positiv ist (PEARSON & SOUSA, 1996; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2007). CARDOSO et al. konnten in einer Studie aus dem Jahr 1998 eine Spezifität sowie eine Sensitivität (Leishmanin in der Konzentration von mindestens  $3 \times 10^6$ /ml) des MST von jeweils 100 % belegen. Der Test eignet sich sowohl für

Screening-Untersuchungen, als auch zur Therapiekontrolle (SOLANO-GALLEGO et al., 2005). Nach mehrmaligen Applikationen kann der Test jedoch falsch-positiv ausfallen (FERNANDEZ-BELLON et al., 2005). Limitierend ist darüber hinaus die Tatsache, dass der Hund zur korrekten Testdurchführung nach 48 bis 72 Stunden wieder vorgestellt werden muss (FERNANDEZ-BELLON et al., 2005) und das Testergebnis stark vom verwendeten „Leishmanin“ abhängt (SOLANO-GALLEGO et al., 2001c; BALEEIRO et al., 2006).

#### **2.1.2.2. Lymphozyten-Proliferationstest**

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der zellulären Immunantwort im Rahmen einer *Leishmania*-spp.-Infektion stellt der Lymphozyten-Proliferationstest dar. Hierbei handelt es sich im Gegensatz zum MST um einen *in-vitro*-Nachweis. Zunächst werden monoklonale Zellen aus dem peripheren Blut isoliert und anschließend mit einem löslichen *Leishmania*-spp.-Antigen und einem Mitogen inkubiert. Das Ausmaß der hierdurch hervorgerufenen Zellproliferation spiegelt sich im Stimulationsindex (SI-Index) wider. Dieser kann aus dem Quotienten aus stimulierten und nicht stimulierten Zellen berechnet werden. Die Beurteilung des SI-Index wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Je nach Autor werden SI-Indices größer als 2 (PINELLI et al., 1994) oder größer als 5 (QUINNELL et al., 2001) als positiv gewertet. Wenn asymptomatische Tiere getestet werden, ist von einer starken Proliferation der durch das lösliche Antigen stimulierten Zellen auszugehen, während symptomatische Tiere eher ein negatives Testresultat aufweisen (ABRANCHES et al., 1991; PINELLI et al., 1994). Ähnlich wie bei asymptomatischen Hunden verhält sich das Testresultat bei erfolgreich behandelten Tieren (BOURDOISEAU et al., 1997a; MORENO et al., 1999; RHALEM et al., 1999; FERNANDEZ-PEREZ et al., 2003). Zur Leishmaniosediagnostik ist dieser Test jedoch nur sehr eingeschränkt brauchbar, da die Sensitivität in einer Studie bei Hunden mit durch Knochenmarkszytologie oder Knochenmarkskultur bestätigter Leishmaniose nur 68,8 % betrug (QUINNELL et al., 2001). Selbst bei klinisch asymptomatischen Hunden konnte lediglich eine geringgradig höhere Sensitivität von 75,3 % verzeichnet werden. Auch in Anbetracht einer niedrigen Spezifität (54,3 %) (QUINNELL et al., 2001) kann dieser Test nicht als Routinetest angesehen werden.

## **2.2. Direkte Nachweisverfahren**

Bei den direkten Erreger-Nachweisverfahren unterscheidet man zwischen Methoden, mit denen der ganze Erreger (Mikroskopie: Zytologie, Histologie) oder dessen DNA mittels PCR nachgewiesen wird (SOLANO-GALLEG0 et al., 2009).

### **2.2.1. Mikroskopische Untersuchung**

Zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund kann das amastigote Leishmanienstadium in gefärbten Präparaten (Giemsa, Leishmain stain) aus geeigneten infizierten Geweben (Knochenmark, Lymphknoten, Haut, Blut) identifiziert werden. So kann die Diagnose mittels zytologischem oder histologischem Nachweis gestellt werden (Maia & Campino, 2008). In den Präparaten sind die Parasiten entweder frei oder intrazellulär in Makrophagen oder Monozyten anzutreffen. Sie können als 2–4 µm große runde bis ovale Organismen dargestellt werden. Das Zytoplasma erscheint in einem schwachen blau. Der relativ große Kern färbt sich rot an. Im rechten Winkel zum Kern lokalisiert befindet sich der dunkel gefärbte Kinetoplast (MAIA & CAMPINO, 2008). Falsch-positive Ergebnisse sind annähernd ausgeschlossen, was sich in einer hohen Spezifität dieser Untersuchungsmethode niederschlägt. Alleinige Färbeartefakte können fälschlicherweise als Leishmanien identifiziert werden (BANETH & AROCH, 2008). Die Sensitivität dieser Methode ist stark abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und wird mit Werten bis zu 93,0 % (ROSYPAL et al., 2005) beschrieben. Sie variiert darüber hinaus abhängig von der Parasitendichte in dem zu untersuchenden Präparat, der Art des zu untersuchenden Gewebes sowie der zu untersuchenden Patientengruppe. Die Sensitivität bei symptomatischen Hunden wurde mit 88,9 % beschrieben (CIARAMELLA et al., 1997), wohingegen asymptomatische Hunde nur in 39,1 % der Fälle als infiziert erkannt wurden (MOREIRA et al., 2007). Durch lange Untersuchungszeiten und die Untersuchung einer hohen Anzahl an Gesichtsfeldern konnte die Sensitivität in Knochenmarksproben und Lymphknotenaspiraten von symptomatischen Hunden auf 94,8 % erhöht werden (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005) (Tabelle 7).

Darüber hinaus können die Erreger auch in Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbten Biopsiepräparaten nachgewiesen werden. Hierfür erwiesen sich Knochenmark sowie Lymphknoten- und Hautbiopsien am besten geeignet. Da jedoch die Sensitivität, abhängig vom untersuchten Gewebe, der Untersuchungsmethode

sowie der klinischen Symptomatik des infizierten Hundes als unter Umständen gering anzusehen ist (MOREIRA et al., 2007), werden häufig zusätzlich immunhistochemische Methoden eingesetzt (Tabelle 7). Gerade bei Proben mit niedriger Leishmaniendichte ist dies sinnvoll (TAFURI et al., 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Immunhistochemie die Sensitivität des mikroskopischen Erregernachweises auch bei asymptomatischen Hunden bis zu 100 % betragen kann (MOREIRA et al., 2007). Zum immunhistochemischen Parasitennachweis eignet sich ein Streptavidin/Peroxidase-Biotin-System unter Verwendung eines kaninen Hyperimmunserums oder poly- oder monoklonaler anti-*Leishmania*-spp.-Antikörper (BOURDOISEAU et al., 1997b; TAFURI et al., 2004). Hier konnte in Geweben symptomatischer Tiere eine Sensitivität von 62,1 % (Hautbiopsie) (XAVIER et al., 2006) sowie von 92,7 % (Lymphknotenbiopsie) (MOREIRA et al., 2007) gezeigt werden. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Sensitivität des mikroskopischen Nachweises von Leishmanien in Hautbiopsien durch den Einsatz immunhistochemischer Methoden um 50,0 % gesteigert werden konnte (TAFURI et al., 2004).

**Tabelle 7:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten des mikroskopischen Nachweises einer Leishmanien-Infektion.

Untersuchungsmethode	Referenzmethode	Untersuchungsmaterial	Sensitivität	Spezifität	Literatur
Mikroskopie (Romanowsky-Färbung)	Mikroskopie/Kultur (Lnn./Knochenmark)	Lymphknoten, Knochenmark	93,0 %	100 %	ROSYPAL et al., 2005
Mikroskopie (Giemsa-Färbung)	Kultur	Lymphknoten, Knochenmark	88,9 %	k. A.	CIAMARELLA et al., 1997
Mikroskopie (Diff-Quick-Färbung)	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Lymphknoten	32,0–75,6 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Mikroskopie (HE-Färbung)	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Lymphknoten	39,1–43,9 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Mikroskopie (HE-Färbung)	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Milz	28,8–36,6 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Mikroskopie (HE-Färbung)	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Knochenmark	12,0–26,8 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Mikroskopie (HE-Färbung)	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Leber	12,0–26,8 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Immunhistochemie	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA	Lymphknoten	65,9–72,7 %	100 %	MOREIRA et al., 2007

Untersuchungsmethode	Referenzmethode	Untersuchungsmaterial	Sensitivität	Spezifität	Literatur
Immunhistochemie	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA)	Milz	61,0–69,6 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Immunhistochemie	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA)	Knochenmark	32,0–58,5 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Immunhistochemie	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA)	Leber	40,0–56,5 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Direkte Immunfluoreszenz	Mikroskopie (Lnn.) +/- ELISA)	Lymphknoten	60,0–92,7 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
Mikroskopie (Giemsa-Färbung)	PCR (Knochenmark)	Lymphknoten, Knochenmark	7,8–92,6 %	100 %	SARIDOMICHELAKIS et al., 2005
Mikroskopie (HE-Färbung)	Mikroskopie (Giemsa: Leber, Milz, Lnn.)	Haut	44,8 %	k. A.	XAVIER et al., 2006
Immunhistochemie	Mikroskopie (Giemsa: Leber, Milz, Lnn.)	Haut	62,1 %	k. A.	XAVIER et al., 2006

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, HE = Hämatoxilin-Eosin, Lnn. = Lymphknoten, k. A. = keine Angabe, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

### **2.2.2. Polymerase Kettenreaktion**

Die PCR ist die heutzutage gängigste Methode des direkten Erregernachweises. Sie kann mit unterschiedlichen Probenmaterialien durchgeführt werden. Als geeignet erwiesen sich Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin und Sperma (FISA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002b; FRANCESCHI et al., 2007), zahlreiche Gewebe, wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Konjunktiven (FISA et al., 2001; SOLANO-GALLEGU et al., 2001a; ANDRADE et al., 2002; REITHINGER et al., 2002; STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA SDE et al., 2008; LEITE et al., 2010; GEISWEID et al., 2013), sowie bereits durch Formalin fixierte Gewebeproben (XAVIER et al., 2006). Gerade bei asymptomatischen oder möglicherweise kurz zuvor infizierten Hunden stellt die PCR im Gegensatz zum Antikörperrnachweis eine sensitive Möglichkeit dar, die Parasiten nachzuweisen. Die PCR ermöglicht den Nachweis der Leishmanien durch das Vorhandensein ihrer DNA und ist unabhängig von der Immunantwort des jeweiligen Hundes (SOLANO-GALLEGU et al., 2011). In einer experimentellen Studie konnte der Erreger im Konjunktivalabstrich mittels PCR bereits nach 45 Tagen nach Infektion nachgewiesen werden (STRAUSS-AYALI et al., 2004).

#### **2.2.2.1. Labortests**

Die Sensitivität der PCR zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund wurde in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich beschrieben (Tabelle 8). Als Einflussfaktoren sind hier die Wahl der Primer, die Anzahl an Kopien der Ziel-DNA, die Methode der DNA-Extraktion, das zu untersuchende Probenmaterial sowie das PCR-Protokoll zu nennen (ALVAR et al., 2004; CORTES et al., 2004; BANETH & AROCH, 2008). Deshalb reicht ein einzelnes negatives Ergebnis bei einem klinisch verdächtigen Tier nicht aus, um einen Leishmanioseverdacht auszuräumen (BANETH & AROCH, 2008; SOLANO-GALLEGU et al., 2009). Durch den individuellen Gewebstropismus der Leishmanien, die heterogene Verteilung der Parasiten in Organen und eine möglicherweise lokale Immunantwort des betroffenen Tieres kann, je nach gewähltem Probenmaterial, die Sensitivität stark beeinflusst werden (MAIA et al., 2009). Gerade bei der PCR mit Vollblut kommt es häufig zu falsch-negativen Ergebnissen, da Dauer und Intensität der Parasitämie unterschiedlich sind (LACHAUD et al., 2002b). Für die PCR (genomische DNA) aus Vollblut wurde eine Sensitivität von 17,0 % beschrieben, während die Sensitivität aus Konjunktivalabstrichen, sowie Milz- und



Lymphknotenaspiraten mit 92,0 %, 77,0 % und 66,0 % deutlich höher ausfiel (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Darüber hinaus kann die Sensitivität dieser Methode durch die Wahl der Primer (kinetoplastische DNA (kDNA) oder genomische DNA), das PCR-Protokoll sowie die Art der DNA-Extraktion und das zu untersuchende Gewebe beeinflusst werden (BANETH & AROCH, 2008). Je nachdem, welche Primer gewählt werden, liegt die zu amplifizierende DNA-Sequenz in sehr unterschiedlicher Menge im Leishmaniengenom vor. Es wird zwischen genomischer, ribosomaler DNA („internal-transcribed-spacer-1“- (ITS1-) Regionen) und Minicircle-Sequenzen von Kinetoplasten-DNA (kDNA) unterschieden. Während die genomische, ribosomale DNA in nur 40–200-facher Kopie vorliegt, liegt die Minicircle-Sequenz der kDNA in 10.000-facher Kopie vor (GOMES et al., 2008). Assays zum Nachweis kinetoplastischer DNA stellten sich daher als besonders sensitiv heraus (MAIA & CAMPINO, 2008; MIRO et al., 2008).

Die Spezifität der PCR wird mit bis zu 100 % beschrieben (konventionelle Knochenmarks-PCR (kDNA) (ROURA et al., 1999); konventionelle Konjunktivaltupfer-PCR (genomische DNA) (STRAUSS-AYALI et al., 2004)). Sie wird jedoch maßgeblich durch die Gefahr von DNA-Kontamination im Rahmen der Testdurchführung beeinflusst. In diesem Zusammenhang stellen falsch-positive PCR-Ergebnisse durch Kreuzkontaminationen die größte Limitation für die Spezifität dieser Methode dar (ROURA et al., 1999; FISA et al., 2001) (Tabelle 8).

Man unterscheidet zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund drei unterscheidliche PCR-Techniken. Hierzu zählen die konventionelle PCR, die real-time-PCR sowie die nested-PCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Die real-time-PCR erwies sich gegenüber konventionellen PCR-Methoden als deutlich sensitiver (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Eine Studie mit natürlich infizierten Hunden konnte belegen, dass die real-time-PCR (kDNA) aus Knochenmark die Infektion schon bei < 1 Parasit/ml nachweisen kann, während bei der konventionellen PCR mindestens 30 Parasiten/ml vorhanden sein müssen (FRANCINO et al., 2006). Zudem ist sie zeiteffektiver und weist ein geringeres Kontaminationsrisiko auf, was zu einer höheren Spezifität führt (ROLAO et al., 2004; VITALE et al., 2004; GOMES et al., 2008).

Bei der konventionellen PCR sowie bei der nested-PCR, bei der das Risiko einer unspezifischen Bindung im Vergleich zur konventionellen PCR zwar deutlich

reduziert, jedoch die Kontaminationsgefahr größer ist, werden in der Regel qualitative Ergebnisse ermittelt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der real-time-PCR standardisiert eine DNA-Quantifizierung, die es ermöglicht, die Parasitenbürde des Patienten in Zahlenwerte zu fassen, und somit die real-time-PCR als geeignete Methode zur Diagnose, jedoch ebenso zum Monitoring der Erregerlast des Patienten zu nutzen. Gerade bei infizierten Patienten, die gegen Leishmanien behandelt werden, ist dies eine effektive Methode zur Verlaufskontrolle (FRANCINO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

Die quantitative real-time PCR basiert auf einer kontinuierlichen Messung von gebildeten DNA-Sequenzen, wobei die DNA-Menge im Template während der exponentiellen Phase mittels Fluoreszenzmessung bestimmt wird. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der Erregerzahl in der jeweiligen Probe. Neben vielen anderen möglichen Protokollen zur Quantifizierung von amplifizierten PCR-Produkten findet SYBR-Green, ein unspezifischer fluoreszierender Farbstoff, welcher sich in die DNA einlagert, am häufigsten Verwendung (NICOLAS et al., 2002; ROLAO et al., 2004). Zum anderen kommt die TaqMan-Technologie heutzutage häufig zum Einsatz. Hier kann die Menge an amplifizierter DNA noch genauer abgeschätzt werden, da spezifische Sonden in die Zielsequenz eingelagert werden (MAIA & CAMPINO, 2008).

**Tabelle 8:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten von unterschiedlichen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), in Abhängigkeit von verwendeten Geweben und Zielsequenzen.

Material	Zielsequenz	Referenzmethode	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<b>Knochenmark</b>	kDNA	ELISA/IFA/Mikroskopie	50,0–77,5 %	78,0–93,0 %	DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012
	kDNA	Mikroskopie	100 %	100 %	ANDRADE et al., 2002
	genom. DNA	Mikroskopie/IFA	95,4 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
<b>Lymphknoten</b>	kDNA	Mikroskopie/IFA	100 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	kDNA	Immunhistochemie	95,6–100 %	100 %	MOREIRA et al., 2007
	genom. DNA	Mikroskopie/IFA	95,4 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	kDNA	Mikroskopie/IFA	100 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	genom. DNA	Kultur/ELISA	67,0 %	k. A.	STRAUSS-AYALI et al., 2004
<b>Blut</b>	kDNA	ELISA/IFA/Mikroskopie	22,5–27,5 %	94,0–100 %	DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012
	kDNA	Mikroskopie/IFA	65,2–100 %	100 %	LACHAUD et al., 2002b
	kDNA	Mikroskopie/IFA	100 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	genom. DNA	Mikroskopie/IFA	81,8 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	genom. DNA	Kultur/ELISA	17,0 %	k. A.	STRAUSS-AYALI et al., 2004
	genom. DNA	Mikroskopie/IFA	81,8 %	100 %	LACHAUD et al., 2002b

Material	Zielsequenz	Referenzmethode	Sensitivität	Spezifität	Literatur
<b>Milz</b>	kDNA	Mikroskopie	71,4 %	100 %	ANDRADE et al., 2002
	genom. DNA	Kultur/ELISA	77,0 %	100 %	STRAUSS-AYALI et al., 2004
	genom. DNA	ELISA/IFA/CFR	91,3–95,6 %	k. A.	PILATTI et al., 2009
	kDNA	Mikroskopie	35,8–78,9 %	k. A.	DI MUCCIO et al., 2012
	kDNA	Mikroskopie	90,0 %	k. A.	LEITE et al., 2010
<b>Haut</b>	kDNA	Mikroskopie/PCR (KM)	78,4 %	93,8 %	GEISWEID et al., 2013
	genom. DNA	ELISA/IFA	52,2 %–73,9 %	k. A.	FERREIRA SDE et al., 2008
	genom. DNA	ELISA/IFA/CFR	73,9 %	k. A.	PILATTI et al., 2009
	genom. DNA	Kultur/ELISA	92,0 %	100 %	STRAUSS-AYALI et al., 2004
	kDNA	ELISA/IFA/Mikroskopie	75,0–95,0 %	61,0–67,0 %	DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012
	kDNA	ELISA/IFA/Mikroskopie	45,0–75,0 %	72,0–100 %	DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012
	kDNA	Mikroskopie/IFA	97,6–100 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a
	genom. DNA	Mikroskopie/IFA	73,3–82,0 %	100 %	LACHAUD et al., 2002a

CFR = complement fixation reaction, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, genom. DNA = genomische DNA, k. A. = keine Angabe, kDNA = kinetoplastische DNA, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IFA = Immunosorbent Assay, KM = Knochenmark

### 2.2.2.2. Schnelltests

In der Humanmedizin nimmt die PCR-basierte Leishmaniosediagnostik einen hohen Stellenwert ein. Da die Durchführung jedoch teuer und nicht überall verfügbar ist und teilweise lange auf Ergebnisse gewartet werden muss, wächst die Nachfrage an PCR-basierten Schnelltests. Diese sollen die Vorteile der hohen Sensitivität und Spezifität der PCR mit einfacher und schneller Durchführbarkeit vereinen (CARSON et al., 2010).

Im Jahr 2009 (ESPINOSA et al., 2009) wurde in Peru ein PCR-Schnelltest zum Nachweis von *Leishmania*-ssp.-DNA beim Menschen („Leishmania OligoC-Test“, CORIS BioConcept, Belgium) auf seine Sensitivität getestet. Dieser Schnelltest beruht auf dem Prinzip der PCR-Amplifizierung von genomischer Leishmanien-DNA (18S-rDNA), gefolgt von der Visualisierung der PCR-Produkte mittels immunchromatographischen Dipstick-Tests mit Gold-Nanopartikeln. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Überführung des Probenmaterials in 100 µl Lysepuffer mit anschließender Inkubation bei 94 °C für 30 Minuten. Als Referenzmethode kam eine kDNA-PCR (*L. braziliensis*) zum Einsatz. Zudem wurde die Infektion bei den Patienten (kutane Leishmaniose) mittels MST und mikroskopisch-parasitologischen Nachweises nach Kultur bestätigt. Die Sensitivität des Schnelltests lag bei Hautgeschabseln bei 92,0 % und übertraf hiermit sogar die Sensitivität der kDNA-PCR (88,0 %). Bei Feinnadelaspiraten der Haut zeigte die Schnelltest-PCR eine Sensitivität von 74,0 %. Angaben zur Spezifität des PCR-Schnelltests wurden jedoch leider nicht gemacht. In einer Folgestudie aus dem Jahr 2010 (SAAD et al., 2010) wurde der OligoC-Test (CORIS BioConcept, Belgium) im Sudan bei Patienten mit viszeraler, kutaner und Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose erneut evaluiert. Bei Patienten mit bestätigter viszeraler Leishmaniose wies der Schnelltest bei Lymphknotenaspiraten eine Sensitivität von 96,8 %, bei Vollblutproben eine Sensitivität von 96,2 % und bei Knochenmarksproben eine Sensitivität von 96,9 % auf. Darüber hinaus wurden alle Patienten mit kutaner und Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose vom Schnelltest erkannt. Die Spezifität des OligoC-Tests (CORIS BioConcept, Belgium) lag hier bei 90,0 %. In Kenia zeigte der OligoC-Test (CORIS BioConcept, Belgium) zum Nachweis der viszeralen Leishmaniose eine Sensitivität von 96,4 % bei einer Spezifität von 88,8 % (BASIYE et al., 2010).

Etwas später wurde ein Assay zur Rekombinase-Polymerase-Amplifizierung (RPA) (RPA-Assay in Form eines Analysekit zur PCR-Testdurchführung vor Ort als annähernd geschlossenes System) zum Nachweis von *L.-donovani*-DNA aus Vollblut für den Menschen entwickelt und mit den Ergebnissen einer quantitativen real-time-PCR verglichen (MONDAL et al., 2016). Bei dieser Methode ersetzen spezifische Enzyme und Proteine die sonst notwendigen temperaturabhängigen Zyklen der DNA-Amplifizierung bei der PCR. Die Amplifizierungsreaktion dieses Assays läuft isothermal bei 42,0 °C ab, und Ergebnisse nach DNA-Extraktion (kommerzielles Extraktionskit SpeedXtract, Qiagen, Hilden, Germany) sind innerhalb von 15 Minuten zu erwarten. In der Testdurchführung wies der RPA-Assay im Vergleich zur real-time-PCR sowohl bei den positiven Proben als auch bei den negativen Proben 100 % Übereinstimmung auf. Darüber hinaus ist es mit diesem Schnelltest möglich, weitere *Leishmania* spp. nachzuweisen (*L. major*, *L. infantum*, *L. aethiopica*). Andere Infektionserreger, wie z. B. *L. tropica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella typhi*, *Plasmodium vivax* oder *Mycobacterium tuberculosis*, zeigten keine positiven Testergebnisse.

Auch in der Tiermedizin wurden in den vergangenen Jahren PCR-Schnelltests entwickelt (Tabelle 9). Im Jahr 2010 wurde ein Test, der ursprünglich für die Humanmedizin entwickelt wurde, und in diesem Bereich durch hohe Sensitivitäten und Spezifitäten überzeugen konnte (ESPINOSA et al., 2009; BASIYE et al., 2010; SAAD et al., 2010), für die Anwendung beim Hund validiert (CARSON et al., 2010). Hierzu wurden Knochenmarksproben von natürlich mit *L. infantum* infizierten Hunden verwendet, die mittels quantitativer real-time-PCR positiv getestet wurden. Im direkten Vergleich zur nested-kDNA-PCR (72,0 % Sensitivität), nested-internal-transcribed-spacer-1-(IST-1-) PCR (54,0 % Sensitivität) und PCR-Hybridisierung (61,0 % Sensitivität) wies der Schnelltest (OligoC-TesT, CORIS BioConcept, Belgium) eine Sensitivität von 70,0 % auf. Einzig die real-time-PCR wies in dieser Studie mit 91,0 % Sensitivität bessere Resultate als der PCR-Schnelltest auf. Die Sensitivität des Schnelltests bei poly- (93,0 %) und oligosymptomatischen (74,0 %) Hunden lag hierbei deutlich höher, als die bei asymptomatischen Hunden (61,0 %). Bei mehr als 74 Leishmanien/ml Knochenmark konnte beim OligoC-TesT (CORIS BioConcept, Belgium) sogar eine Sensitivität von 100 % demonstriert werden.

Eine Studie aus dem Jahr 2012 (ANDREADOU et al., 2012) verglich die Performance von zwei in-house-PCR, einem kommerziell erhältlichen PCR-Schnelltest (Genekam Biotechnology AG, Germany) und einer real-time-PCR. Anhand der Referenzmethode (in-house-Assay mit der höchsten positiven Übereinstimmung im Zusammenhang mit den ausgewählten klinischen Proben) wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten der real-time-PCR, der anderen in-house-PCR und des kommerziell erhältlichen PCR-Schnelltests berechnet. Hierbei betrug die Sensitivität der in-house-PCR 50,7 %. Die Spezifität lag bei 90,8 %. Die Sensitivität des kommerziell erhältlichen PCR-Schnelltests lag bei 43,0 %, die Spezifität lag bei 93,4 %.

Eine weitere Schnelltest-PCR („*Leishmania*-FAST15“), basierend auf den Primern eines bewährten real-time-PCR-Protokolls (FRANCINO et al., 2006) zum Nachweis von kinetoplastischer *L. infantum*- und *L. braziliensis*-DNA in Blutproben, wurde entwickelt (DANTAS-TORRES et al., 2017). Die Vorteile dieses neuen Assays sind ein niedriges Reaktionsvolumen, geringere Kosten sowie eine kürzere Durchführungszeit. Die Übereinstimmung zwischen „*Leishmania*-FAST15“ und der ursprünglichen PCR (FRANCINO et al., 2006) stellte sich als annähernd perfekt heraus ( $Kappa = 0,90$ ;  $p < 0,0001$ ). Jedoch eignete sich dieser Test nicht als „PCR-Schnelltest“, da ein beträchtlicher materieller Aufwand für die Testdurchführung notwendig ist (DANTAS-TORRES et al., 2017).

Ein neuer Ansatz von Tests auf PCR-Basis sind loop-mediierte isothermale Amplifizierungs- (LAMP-) Assays (CHAOUCH et al., 2013). LAMP verbindet die Vorteile der hohen Sensitivität eines molekulardiagnostischen Tests mit der Möglichkeit der Testdurchführung unter Feldbedingungen und ohne aufwändige technische Hilfsmittel. Hierbei werden vier bis sechs Primer, die spezifisch sechs bis acht Regionen der Ziel-DNA (hier das Cystein-Protease-B-(cpb-) multi-copy-Gen) erkennen, zusammen mit Enzymen zur Spaltung des DNA-Doppelstranges verwendet. Die gleichzeitige Initiierung der DNA-Synthese durch die Zugabe von Primern macht diese Technik sehr spezifisch. Das polymorphe und in hoher Anzahl auftretende cpb-Gen erlaubt es, sowohl zwischen *Leishmania* spp. zu unterscheiden, als auch speziesspezifische und sensitive LAMP-Assays zu kreieren (NOTOMI et al., 2000; CHAOUCH et al., 2013). Im direkten Vergleich des LAMP-Assays zum IFA (88,6 % Sensitivität, 52,5 % Spezifität), real-time-PCR (37,1 % Sensitivität, 82,5 % Spezifität) und Mikroskopie (Referenzmethode) wies der

LAMP-Assay unter Verwendung von Blut (DNA-Extraktion mittels Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, WI, USA) eine Sensitivität von 54,0 % bei einer Spezifität von 80,0 % auf (CHAOUCH et al., 2013).



**Tabelle 9:** Übersicht der Sensitivitäten und Spezifitäten tiermedizinischer Polymerase-Kettenreaktion- (PCR-) Schnelltests.

Schnelltest	Zielsequenz	Referenzmethode	Sensitivität	Spezifität	Literatur
OligoC-Test	genom. DNA	real-time-PCR (KM)	61,0–100%	100 %	CARSON et al., 2010
In-hous-PCR	kDNA	Kultur/IFA/PCR	50,7 %	91 %	ANDREADOU et al., 2012
PCR-Assay	k. A.	Kultur/IFA/PCR	43,0 %	93,4 %	ANDREADOU et al., 2012
LAMP-Assay	genom. DNA	Mikroskopie/PCR/IFA	54,0 %	80,0 %	CHAOUCH et al., 2013

genom. DNA = genomische DNA, IFA = Immunofluorescence Assay, k. A. = keine Angabe, kDNA = kinetoplastische DNA, KM = Knochenmark, LAMP = Loop-mediated Isothermal Amplification

### III. PUBLIKATION

#### **Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis**

R. Selder<sup>1</sup>

K. Weber, DrMedVet, DrHabil<sup>1</sup>

M. Bergmann, DrMedVet<sup>1</sup>

K. Geisweid, DrMedVet, DipECVIM-CA<sup>1</sup>

K. Hartmann, DrMedVet, DrHabil, DipECVIM-CA<sup>1</sup>

1) Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Germany

The Veterinary Journal, veröffentlicht im Februar 2018

Vet J. 2018 Feb; 232: 46-51. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.006. Epub 2017 Dec 9



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

## Original Article

## Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis



R. Selder\*, K. Weber, M. Bergmann, K. Geisweid, K. Hartmann

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

## ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 7 December 2017Keywords:  
Dog  
Leishmania  
PCR  
In-house test  
Rapid test

## ABSTRACT

Canine leishmaniasis is an important infectious disease worldwide. Although commonly used, antibody tests are often falsely negative, and in such cases direct detection of the pathogen, such as PCR, is necessary. However, PCR is only performed in specialized laboratories and not available in all localities. The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care (ICPOC) PCR for the diagnosis of canine *Leishmania* spp. infection to those of a well characterized reference real-time PCR. In this study, 515 samples from 251 dogs (201 EDTA blood samples, 244 conjunctival swabs, 19 lymph node aspirates, and 51 bone marrow aspirates) were collected prospectively and analysed for the presence of *Leishmania* DNA using an ICPOC test. The results were compared to those of a reference real-time PCR for identification of *Leishmania* kinetoplast minicircle DNA. Sensitivity and specificity with 95% confidence interval (CI 95%) were determined.

Specificity was 100% for all samples examined. Sensitivity was 57.1% (CI 95%, 34.0–78.2) in bone marrow aspirates, 58.8% (CI 95%, 32.9–81.6) in lymph node aspirates, 46.9% (CI 95%, 32.5–61.7) in conjunctival swabs, and 10.0% (CI 95%, 3.3–21.8) in blood. The ICPOC PCR was easy to perform and was reliable in the case of positive test results. A negative result, however, did not exclude infection and therefore requires further diagnostics.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Canine leishmaniasis is an infectious disease with zoonotic potential and increasing importance in Central Europe, since the number of imported dogs and dogs that have travelled to endemic countries is constantly rising (Mettler et al., 2005). Therefore, fast and reliable methods for the detection of *Leishmania* spp. infection in dogs are essential to prevent transmission from subclinically infected dogs and to avoid the introduction of infected dogs into non-endemic countries. Rapid detection is also important to confirm infection status prior to treatment for leishmaniasis. The sensitivity of antibody detection methods, such as immunofluorescence assays (IFA) or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) is often insufficient for clinical purposes. It can take up to 3 years for antibodies to be detected after infection (Solano-Gallego et al., 2005) and some dogs remain antibody-negative indefinitely (Solano-Gallego et al., 2001; Leontides et al., 2002). Moreover, antibody detection tests can produce false positive

results due to cross reactivity with antibodies against other infectious agents.

PCR analysis of bone marrow is considered the reference standard for the diagnosis of leishmaniasis in dogs, since it is more sensitive than PCR analysis of other tissues (Maia and Campino, 2008). In the search for appropriate tissues that could be obtained less invasively, direct pathogen detection by PCR from conjunctival swabs has been investigated and was sensitive for the diagnosis of *Leishmania* spp. infections in both diseased dogs (92.0% sensitivity; Strauss-Ayali et al., 2004) and asymptomatic dogs in endemic regions (90.0% sensitivity; Leite et al., 2010), as well as in non-endemic areas (78.4% sensitivity; Geisweid et al., 2013). Thus, PCR of conjunctival swabs is considered the test of choice to detect *Leishmania* spp. infection. The major disadvantage of PCR in general is that samples need to be sent to specialized laboratories, leading to potential delays until results are available. Moreover, transport holds the risk of sample loss or DNA destruction. In addition, there are many localities where canine leishmaniasis is endemic that do not have specialized laboratories offering PCR. Consequently, an accurate and specific diagnostic test that could be performed directly on-site at veterinary practices could be very helpful.

Therefore, the aim of this study was to compare the sensitivity, specificity and practicability of an in-clinic point-of-care ICPOC

\* Corresponding author.

E-mail address: [Vorstandsassistenz@medizinische-kleintierklinik.de](mailto:Vorstandsassistenz@medizinische-kleintierklinik.de) (R. Selder).

PCR (PCRun; Biogal Galed Labs ACS) for the detection of *Leishmania* spp. infection in dogs to those of a well characterized real time PCR performed under optimal conditions. The ICPOC PCR was based on the principle of isothermal amplification and could be visualized in two different ways ('Ustar analysis' and 'Reader analysis').

### Materials and methods

#### Dogs

Two hundred and fifty-one dogs, of varying age, sex and breed, were included in the study. All dogs were presented to the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany. Dogs suspect for *Leishmania* spp. infection ( $n = 105$ ) and control dogs ( $n = 146$ ; no clinical signs of infection, no travelling history to or origin from endemic regions) were included without further exclusion criteria. Blood samples ( $n = 201$ ), conjunctival swabs ( $n = 244$ ), lymph node aspirates ( $n = 19$ ), and bone marrow samples ( $n = 51$ ) were collected.

The protocol was accepted by the Ethical Committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich (Protocol number: 36-11-11-2014; Approved date: 15th December, 2014).

#### Sample collection

Blood samples (2–5 mL EDTA blood) were collected and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction.

For the collection of conjunctival swab samples, exfoliative epithelial cells from both eyes were collected using sterile cotton swabs. These were rubbed against the inner surface of the lower eyelid of both eyes until the cotton surface was pale rose in color. Swabs were air-dried for 1 min and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction.

Lymph node fine needle aspirates were obtained by sampling the popliteal lymph nodes (5 mL syringe, 20-gauge needle). Aspirates were transferred to a sterile cotton swab and then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  in sterile tubes until DNA extraction.

Bone marrow was aspirated from the humerus with a thin biopsy needle (Monoject, Illinois sterna illias aspiration needle, Kendal) using a sterile procedure under general anesthesia. Bone marrow aspirates (500  $\mu\text{L}$ ) were transferred to EDTA-coated tubes (tube 2 mL, Sarsted) and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction.

#### DNA extraction

For the extraction of DNA from blood (Animal Blood Spin-Column Protocol), conjunctival swabs, and lymph node aspirates (Buccal Swab Spin Protocol), DNeasy Blood and Tissue kits (Qiagen) were used, following the manufacturer's instructions. Incubation of the samples with proteinase K led to initial lysis. Subsequent transferral of the lysates to DNeasy Mini spin columns achieved DNA adsorption to DNeasy membranes. Two centrifugation steps followed. Purified DNA was eluted in elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) at a final volume of 100  $\mu\text{L}$ .

DNA extraction of bone marrow aspirates was performed as described previously (Geisweid et al., 2013). Briefly, bone marrow aspirates (500  $\mu\text{L}$ ) were incubated on ice for 20 min using 2.5 milliliters (mL) of lysis buffer (SDS solution 10%, 1 M Tris pH 7.5, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, distilled water). The reagents were later centrifuged at 1900 g for 10 min. Cell pellets were incubated with 150  $\mu\text{L}$  of lysis buffer and 5  $\mu\text{L}$  of proteinase K at  $56^{\circ}\text{C}$  for 12 h. Extraction was performed by adding 125  $\mu\text{L}$  of phenol-chloroform-isoamylalcohol to 150  $\mu\text{L}$  of lysate. Organic and aqueous phases were separated by centrifugation at 18,000 g for 2 min. For the precipitation of DNA, 50  $\mu\text{L}$  of isopropanol and 50  $\mu\text{L}$  of 4 M ammonium acetate (pH 7.5) were added to the supernatant. After centrifugation at 18,000 g for 5 min, the precipitate was washed using 70% ethanol. The DNA pellet was later resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of TE buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0).

#### Reference PCR

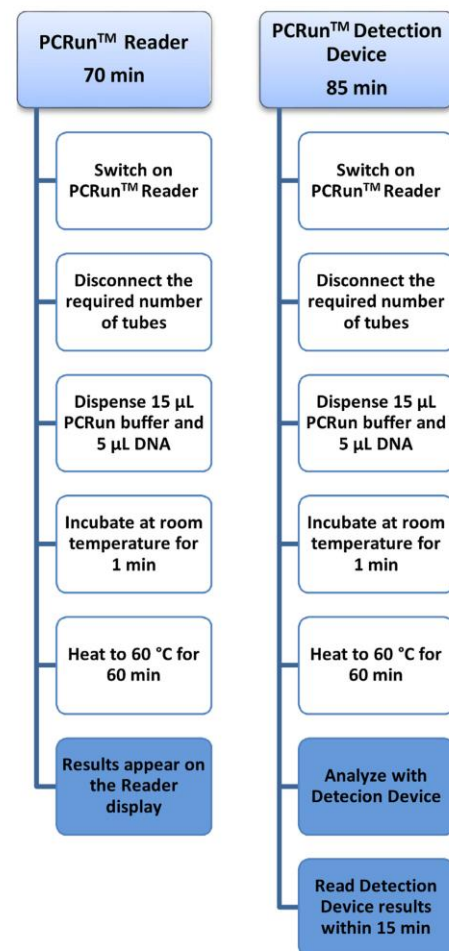
The PCR protocol was adapted from Francino et al. (2006), with minor modifications, as described by Geisweid et al. (2013). *Leishmania* spp.-specific oligonucleotide primers N13A (5'-AACTTTCTGGTCCTCCGGG-3') and N13B (5'-CCCCAGTTTCCGCCCC-3') were used to amplify a 120-base-pair fragment of *Leishmania* kinetoplast minicircle DNA. The PCR was performed with the 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, Applera) in a final volume of 30  $\mu\text{L}$ . The PCR reaction mixture consisted of 15  $\mu\text{L}$  of Qiagen Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), added to 11.4  $\mu\text{L}$  distilled water, 0.3  $\mu\text{L}$  primer F N13A (25 picomol [ $\mu\text{mol}$ ]/ $\mu\text{L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  primer R N13B (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ) and 3  $\mu\text{L}$  template. The PCR protocol included initial denaturation (95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min), followed by 40 cycles of denaturation at 94  $^{\circ}\text{C}$  for 15 s, annealing at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s and extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 35 s. For every run, DNA from a dog with confirmed infection (positive bone marrow cytology) served as positive control. Furthermore, negative (no template) controls were included in all tests. Finally, amplified fragments were analyzed by melting curve analysis. Ten positive PCR products were run on a 1.5% agarose gel containing Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium) and visualized under ultraviolet (UV) light to confirm the correct size of the amplicates. In addition, one PCR-positive sample was sequenced by a commercial laboratory (Eurofins genomics).

#### In-clinic point-of-care PCR

The ICPOC PCR was performed according to the manufacturer's instructions (Fig. 1). A device for isothermal amplification and amplicate detection was adjusted to 60  $^{\circ}\text{C}$ . Reaction tubes containing lyophilized reaction components (buffer, primers (kDNA target genes), polymerase, luciferin, luciferase, ammonium persulfate (APS), and ATP sulphurylase) were used. Fifteen microliters ICPOC test buffer and 5  $\mu\text{L}$  templates were added to the reaction tubes, which were then incubated at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 60 min in the ICPOC test reader. As a positive control, 5  $\mu\text{L}$  synthetic *Leishmania infantum* (*L. infantum*) DNA was added as template, and a no template control containing 5  $\mu\text{L}$  sterile purified water was included in every run. Two different methods, the ICPOC test reader ('Reader analysis') and the ICPOC test detection device ('Ustar analysis') were used to visualize the results.

#### Reader analysis

The ICPOC test reader contained a bioilluminator to visualize PCR amplicates. In every run, 14 clinical samples, one positive control (synthetic *L. infantum*-DNA) and one negative control (sterile purified water) were tested in the 16 reaction cavities



**Fig. 1.** Direct comparison of the two DNA detection devices, the in-clinic point-of-care (ICPOC) test reader ('Reader analysis') and the ICPOC test detection device ('Ustar analysis') after DNA extraction.

of the ICPOC test reader. The light detectors collected the bioluminescent signals every 30 s. As the amplification proceeded, light emission increased, until the concentration of pyrophosphate produced during the reaction became too high for the luciferase that was included in the reaction pellet. Light emission decreased rapidly, and the signal was converted into numbers. Positive samples displayed '+' in red on the reader including the time to reach the light peak, while negative samples displayed '-' in green (Fig. 2). Time to reach the light peak was inversely proportional to the target copy number. This method is recommended when several samples are tested at the same time.

#### Ustar analysis

The second option for the detection of *L. infantum*-DNA was the 'Ustar analysis', using Disposable Nucleic Acid Devices (Ustar Biotechnologies; Fig. 3). Each disposable nucleic acid detection device was packed with a detection strip utilizing an antibody-based immunochromatographic sandwich mechanism. This principle was based on the principle that in samples with specific amplicons, colored particles labeled with antibodies specific to the target analyte bind to these specific amplicons and reach the positive line on the detection strip, where further

antibodies specific to the target analyte are bound. This causes a visual change on the positive line.

Directly after heating the DNA preparations at 60 °C for 60 min in the ICPOC test reader, the ICPOC test reaction tubes were separated and tested individually, according to the manufacturer's instructions. Each reaction tube was placed into the holder of the device cartridge and the cartridge was then closed. After inserting the cartridge into the detection device, the handle had to be pushed to the locked position. At this step, a running buffer reservoir and the ICPOC test reaction tube were mechanically opened by razor blades at the bottom of the detection device. The results were visible within 15–30 min on the detection strip. With a negative result, only the control line appeared; with a positive result, the control line and a positive line appeared (Fig. 3). This method is recommended mainly for testing individual samples, as is likely the case for most small animal practices.

#### Statistical methods

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the ICPOC PCR, including 95% CI were calculated using contingency tables (MedCalc statistical software).

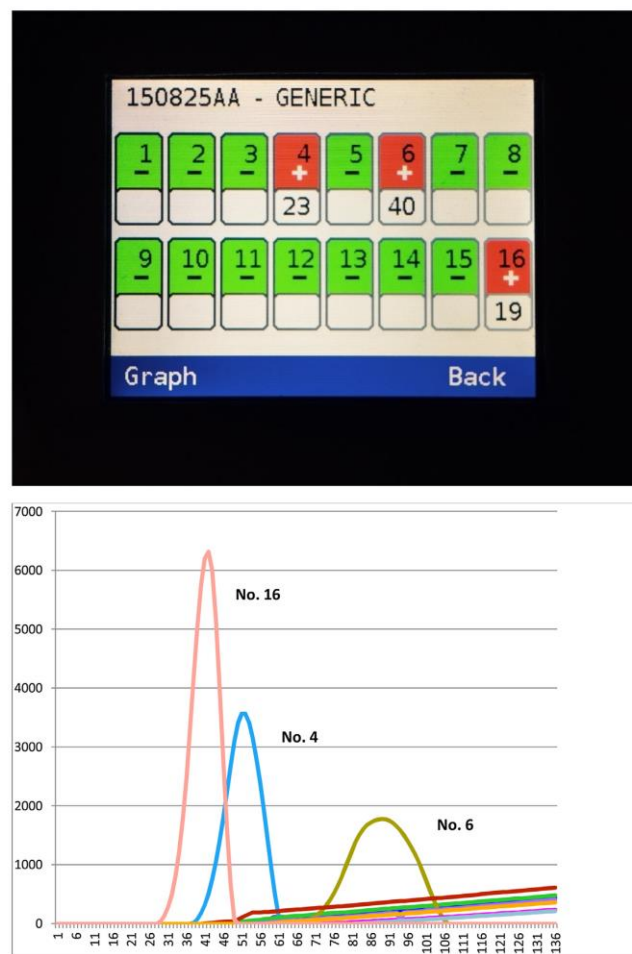
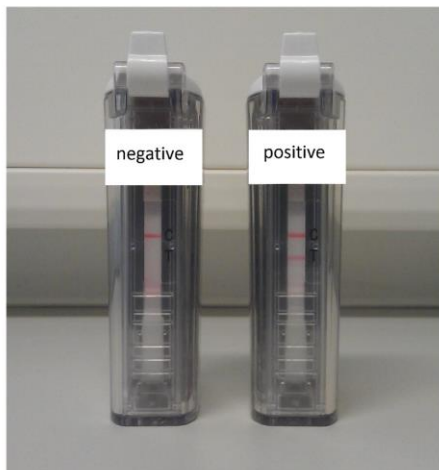


Fig. 2. Commercially available in-clinic point-of-care (ICPOC) test reader ('Reader analysis'). ICPOC reader results are shown on the display: '+' in red for positive results, '-' in green for negative results and the corresponding melting curves.





**Fig. 3.** Commercially available Disposable Nucleic Acid Device used for Ustar analysis. The detection device on the right side shows a positive result with a control line and a positive line, the one on the left side shows a negative result without positive line.

### Results

One hundred and thirty-seven of the 515 tested samples were positive in the reference real time PCR, and 378 of the tested samples were negative (Table 1). Eighty-seven dogs were classified as 'infected' (positive in blood and/or bone marrow and/or lymph node aspirate and/or conjunctival swab reference PCR) and 164 dogs were classified as 'not infected' (negative in blood and bone marrow and lymph node aspirate and conjunctival swab reference PCR).

The practicability of the ICPOC test was excellent in all 515 samples and after DNA extraction, the ICPOC test was easy to perform. When comparing the two detection methods, the 'Reader analysis' procedure took about 70 min until results were visible on the ICPOC test reader display, and results were always clearly interpretable. The 'Ustar analysis' procedure took approximately 85 min until results could be seen on the ICPOC test detection device. The readability of the ICPOC test detection device results was clear and results were distinctly visualized within the expected time period (Fig. 1).

There were no differences between the results obtained by the ICPOC test reader ('Reader analysis') and the ICPOC test detection device ('Ustar analysis') for all 515 samples.

There were no false positive results using the ICPOC test. Thus, specificity was 100.0% (CI 95%, 99.0–100.0). However, sensitivity varied between tissues (Table 2).

Six samples with discordant results in the reference real-time PCR and in the ICPOC test (all six positive in the reference PCR and negative in the ICPOC test), and four samples with concordant results in the reference real-time PCR and in the ICPOC test (three negative samples and one positive sample) were verified by gel electrophoresis. All samples positive in the reference PCR ( $n=7$ ) revealed single bands with the expected size for *Leishmania* spp., whereas all samples negative in the reference PCR ( $n=3$ ) did not.

One reference real-time PCR-positive ICPOC test-negative conjunctival swab sample was sent to a sequencing laboratory. The DNA sequence confirmed presence of *Leishmania* spp. kinetoplast minicircle sequence, but due to the primer position, the *Leishmania* species could not be identified.

### Discussion

The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of an ICPOC PCR for the detection of *Leishmania* spp. in dogs to the results of a well characterized real-time PCR under optimal conditions and to determine the practicability of this ICPOC test.

The ICPOC test had 100% specificity in this study when compared to the reference real time PCR; thus, ICPOC test positive results were diagnostic. However, the sensitivity of the ICPOC was relatively low, since only 50 of the 137 samples that were positive in the reference PCR were ICPOC-positive. There are several possibilities to explain these discrepancies. It is possible that the ICPOC test was not able to detect all *Leishmania* spp. strains. Primers in the ICPOC test were specific for *L. infantum*, according to the manufacturer's information. Therefore, it is possible that some dogs were infected with other *Leishmania* spp. (e.g. *L. tropica* or *L. donovani*), to which the *L. infantum*-specific primers of the ICPOC test did not bind. The oligonucleotide primers used in the reference real-time PCR were specific for *L. infantum* in previous reports (Francino et al., 2006; Geisweid et al., 2013). Although the possibility that the reference PCR might have detected other *Leishmania* spp. cannot be completely excluded, it is not considered very likely. Other *Leishmania* spp., such as *L. tropica* or *L. donovani* have been reported in the Middle East, North Africa, and parts of South Eastern Europe (Baneth et al., 2014), and in India and Africa (Hassan et al., 2009; Alam et al., 2013; Akter et al., 2016), or only occur on the American continent, such as *L. braziliensis* or *L. mexicana*. Except for five participating dogs that had travelled either to Thailand, Turkey, Russia, Burma, or the USA, all dogs had spent their whole lives in Europe.

Another explanation for the low sensitivity of the ICPOC test could be false positive results in the reference PCR. However, the reference PCR protocol with *Leishmania* spp.-specific mononucleotide primers has been used in several previous studies (Francino

**Table 1**

Positive and negative samples ( $n=515$ ) from 251 participating dogs tested with the in-clinic point-of-care (ICPOC) test compared to the reference real-time PCR. Samples were subdivided according to their origin.

		Blood	Conjunctival swab	Lymph node	Bone marrow	Total
Real-time PCR	Total	201	244	19	51	515
	Positive	50	49	17	21	137
	Negative	151	195	2	30	378
ICPOC test	True-positive	5	23	10	12	50
	False-positive	0	0	0	0	0
	True-negative	151	195	2	30	378
	False-negative	45	26	7	9	87

**Table 2**

Specificity, sensitivity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the in-clinic point-of-care (ICPOC) test in blood, conjunctival swab, lymph node, and bone marrow, including 95% confidence interval (CI 95%) and prevalence of infection determined by the reference real-time PCR.

	Blood (n = 201)	Conjunctival swab (n = 244)	Lymph node (n = 19)	Bone marrow (n = 51)
Specificity (CI 95%)	100.0% (97.6–100.0%)	100.0% (98.1–100.0%)	100.0% (15.8–100.0%)	100.0% (88.4–100.0%)
Sensitivity (CI 95%)	10.0% (3.3–21.8%)	46.9% (32.5–61.7%)	58.8% (32.9–81.6%)	57.1% (34.0–78.2%)
PPV (CI 95%)	100.0% (47.8–100.0%)	100.0% (85.2–100.0%)	100.0% (69.2–100.0%)	100.0% (73.5–100.0%)
NPV (CI 95%)	77.0% (70.5–82.7%)	88.2% (83.2–92.2%)	22.2% (2.8–60.0%)	76.9% (60.7–88.9%)
Prevalence (CI 95%)	24.9% (19.1–31.5%)	20.1% (15.2–25.7%)	89.5% (66.9–98.7%)	41.2% (27.6–55.8%)

et al., 2006; Geisweid et al., 2013). The study by Francino et al. (2006) demonstrated reliable results for this PCR using the same primers, and 30 and more parasites/mL sample (blood and bone marrow) were detected positive with this PCR. Furthermore, in 2013, Geisweid et al. used the same PCR protocol testing blood, bone marrow, lymph node, and conjunctival swab samples for the detection of *Leishmania* spp., and all reference PCR-positive results were all verified as true positives by gel electrophoresis. In addition, in the present study, when using gel electrophoresis in six samples with discordant results and sequencing, these methods also always confirmed the results of the reference PCR. Therefore, false positive reference PCR results are very unlikely. This also justified the use of this specific PCR protocol as a reference for the present study.

Finally, it is possible that relatively high amounts of extracted DNA were required for the ICPOC test to generate a positive result and that not all of the samples contained adequate amounts. The reference PCR might have detected samples with a low DNA load, while the ICPOC test did not. This could explain why samples with an expected high parasite load, such as bone marrow (Maia and Campino, 2008) or lymph node aspirates (Manna et al., 2004; Maia et al., 2009; Ramos et al., 2013) were commonly detected by the ICPOC test, while in blood samples with expected low parasite loads (De Almeida Ferreira et al., 2012), only 10.0% (n = 5/50) of infected dogs were detected by the ICPOC test. A previous study (Waner et al., 2014) tested blood samples with an ICPOC test for *Ehrlichia canis* DNA and compared the results to a reference real-time PCR in experimentally infected dogs and demonstrated very similar results. Specificity in that study was also excellent at 100.0%, whereas the sensitivity of the ICPOC test was relatively low (30.0%). Interestingly, in the acute phase of experimental *E. canis* infection, when bacterial load is considered high, sensitivity of the ICPOC test was high (75.0%), but later with decreasing bacterial load, sensitivity declined drastically. This suggests that the reliability of the ICPOC test results might depend on the amount of extracted DNA in the tested samples.

One limitation of the present study was that not all tissue samples could be obtained in every participating dog. This was because less invasive sample types, such as conjunctival swabs or blood samples, were preferred by dog owners over invasive diagnostic measures such as bone marrow aspirates. Furthermore, dogs could have been infected with other pathogens that could potentially cause cross reactions with *Leishmania* spp. PCR, and diagnostic tests for those other pathogens were not performed in this study. Additionally, the prevalence of infection in Germany is unknown and both PPV and NPV of the ICPOC test (Table 2) depend on the prevalence of infection.

In comparison to commercially available antibody assays (Speed Leish K, Virbac; ID Screen, VET-Innovate ID Diagnostics; Leiscan, Esteve Veterinaria; *Leishmania* 96, Agrolabo S.p.A.; in-house IFAT) with sensitivities between 63.6–95.3% (Solano-Gallego et al., 2014), the sensitivity of the ICPOC test used in the present study was relatively low. Antibody detection methods

were not performed and therefore, no direct comparison between the ICPOC test and antibody detection tests could be made. Thus, it would be very valuable to perform comparison studies using field samples from dogs with confirmed *Leishmania* spp. infection status in the future.

This study tested the hypothesis that the ICPOC test would have the same sensitivity and specificity as a well characterized real-time PCR under optimal laboratory conditions for the diagnosis of canine *Leishmania* spp. infection. The ideal clinical reference standard to compare the test with would be dogs with a definitive diagnosis or exclusion of the disease leishmaniasis. The use of an imperfect standard is not ideal for calculations of sensitivity and specificity. However, due to prolonged subclinical periods in canine *Leishmania* spp. infections, this approach was necessary. Given that both tests in this study use the same diagnostic platform (PCR) and both might potentially have the same target sequences, data interpretation is compromised under these circumstances without further non-DNA based diagnostics. In particular, it is possible that both the ICPOC test and a reference real-time PCR could misdiagnose the same subpopulation of infected dogs if differences are sequence-based. One further limitation of the ICPOC test for use in private practice in the future will be the fact that DNA extraction must be conducted under conditions that minimize the risk of DNA contamination. In this context, in-clinic quality control procedures and standard-operating procedures related to suitable work environments, work processes, and training of personnel are highly recommended to ensure reliable test results.

## Conclusions

In conclusion, the ICPOC test was easy to perform under practice conditions. Results were displayed within the time specified by the manufacturer and showed good readability in both detection methods. The ICPOC test was reliable in the case of positive results. However, due to low test sensitivity, negative results should be confirmed using reference testing. Thus, for animals that test positive, the ICPOC test could be a valuable tool to generate fast results when a quick decision, such as for treatment or control measures (Fraga et al., 2016), is crucial, especially in localities without access to laboratories that offer PCR tests. However, the usefulness of this ICPOC PCR is limited due to the need to perform further diagnostics when the ICPOC PCR is negative.

## Conflict of interest statement

This study was funded by Biogal Galed Labs ACS, Galed Israel. Biogal Galed Labs ACS, Galed Israel, played no role in the study design, in the collection and interpretation of data, or in the decision to submit the manuscript for publication. None of the authors has any other financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

### Acknowledgement

We would like to thank Biogal (Biogal Galed Labs ACS, Galed Israel) for funding and supporting this study by providing the ICPOC test and all associated reagents. Preliminary results were presented as an oral presentation at the 26th Annual ECVIM-CA Congress in Gothenburg, Sweden, 8–10 September 2016.

### References

- Alam, M.Z., Yasin, G., Kato, H., Sakurai, T., Katakura, K., 2013. PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral Leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *The Journal of Veterinary Medical Science* 75, 75–78.
- Akter, S., Alam, M.Z., Nakao, R., Yasin, G., Kato, H., Katakura, K., 2016. Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral Leishmaniasis-endemic areas of Bangladesh. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 795–799.
- Baneth, G., Zivotofsky, D., Nachum-Biala, Y., Yasur-Landau, D., Botero, A.M., 2014. Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasites and Vectors* 7, 118.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1596.
- Fraga, D.B., Pacheco, L.V., Borja, L.S., Tuy, P.G., Bastos, L.A., Solca Mda, S., Amorim, L. D., Veras, P.S., 2016. The rapid test based in *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral Leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004333.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 137, 214–221.
- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2013. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *The Veterinary Journal* 198, 187–192.
- Hassan, M.M., Osman, O.F., El-Raba'a, F.M., Schallig, H.D., El-naïem, D.E., 2009. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasites and Vectors* 2, 26.
- Leite, R.S., Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology* 170, 201–206.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M.E., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology* 109, 19–27.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology* 158, 274–287.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal* 179, 142–144.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 125, 251–262.
- Mettler, M., Grimm, F., Naucke, T.J., Maasjost, C., Deplazes, P., 2005. Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 118, 37–44.
- Ramos, R.A., Ramos, C.A., Santos, E.M., de Araujo, F.R., de Carvalho, G.A., Faustino, M. A., Alves, L.C., 2013. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 22, 346–350.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 560–563.
- Solano-Gallego, L., Lluell, J., Ramis, A., Fernandez-Bellon, H., Rodriguez, A., Ferrer, L., Alberola, J., 2005. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 815–818.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., Natale, A., 2014. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors* 7, 111.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1729–1733.
- Waner, T., Nachum-Biala, Y., Harrus, S., 2014. Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *The Veterinary Journal* 202, 618–621.



## IV. DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, die Sensitivität und Spezifität eines Polymerase-Kettenreaktion-Schnelltests (PCRun), entwickelt zum Nachweis einer *Leishmania*-spp.-Infektion beim Hund, zu bestimmen. Darüber hinaus sollte die Durchführbarkeit und Praxistauglichkeit dieses in-house-Tests beurteilt werden. Da diese Studie auf den direkten Vergleich zwischen dem PCR-Schnelltest und einer validierten Referenz-PCR ohne weitere eingeschlossene Diagnostik abzielte, wurden bei der Patientenauswahl bewusst keine Einschränkungen getroffen. In die Studie wurden zum einen Hunde ohne klinische oder labordiagnostische Auffälligkeiten und unabhängig von einem möglichen Auslandsvorbericht integriert. Zum anderen wurden Hunde mit einer bereits diagnostizierten Leishmaniose, und solche mit klinischen oder labordiagnostischen Auffälligkeiten, die im Zusammenhang mit einer Leishmaniose stehen könnten, eingeschlossen. Jedoch hatte die bei an Leishmaniose erkrankten Einzeltieren bereits zuvor durchgeführte Diagnostik keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie. Der Vergleich zwischen PCRun und der Referenz-PCR wurde in Bezug auf jegliche vorherige Diagnostik geblindet durchgeführt. Somit wurden Leishmaniose-positive Hunde eingeschlossen, die im Rahmen von Kontrolluntersuchungen an der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt wurden, ebenso wie Hunde, bei denen zuvor noch keine Diagnostik durchgeführt wurde. Für die vermeintlich *Leishmania*-spp.-negativen Hunde aus der Kontrollgruppe wurden Hunde, die entweder stationär oder ambulant an der Medizinischen Kleintierklinik aus anderen Gründen als zur Leishmanioseabklärung vorgestellt wurden, herangezogen.

In dieser Studie traten keine falsch-positiven Ergebnisse auf. Daher erwies sich die PCRun als sehr spezifisch zur Diagnose der kaninen Leishmaniose. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass positiv getestete Tiere auch tatsächlich infiziert sind und ein positives Ergebnis als diagnostisch angesehen werden kann. Die Sensitivität der PCRun war jedoch deutlich niedriger. Nur 50 von 137 in der Referenz-PCR als positiv getestete Hunde wurden in der PCRun als solche erkannt. Abhängig von den untersuchten Geweben lag die Sensitivität zwischen 10,0 % (Blut) und 58,8 % (Lymphknoten-Feinnadelaspirate). Für die niedrige Sensitivität kommen mehrere Ursachen in Betracht. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die PCRun nicht alle *Leishmania* spp., die möglicherweise in den Proben anzutreffen waren, identifizieren konnte. Laut Herstellerangabe sind die Primer, die für die PCRun

verwendet werden, spezifisch für *L. infantum*. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der Hunde eventuell mit anderen *Leishmania* spp., wie beispielsweise *L. donovani* oder *L. tropica*, infiziert waren und aus diesem Grund die PCRun aufgrund der *L.-infantum*-spezifischen Primer nicht in der Lage war, den Erreger nachzuweisen. Leider sind die Primer der PCRun nicht bekannt, da sie vom Hersteller geheim gehalten werden. Die Primer der Referenz-PCR wurden in früheren Studien (FRANCINO et al., 2006; GEISWEID et al., 2013) als *L.-infantum*-spezifisch beschrieben. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Referenz-PCR auch andere *Leishmania* spp., wie zum Beispiel *L. braziliensis*, nachweisen konnte, da die Primer nicht *Leishmania*-spp.-spezifisch gewählt sind (DANTAS-TORRES et al., 2017). Diese Annahme erscheint jedoch relativ unwahrscheinlich, da die geographische Ausbreitung anderer *Leishmania* spp., abgesehen von *L. infantum*, sich entweder, wie *L. donovani* oder *L. tropica*, auf den mittleren Osten, Nordafrika oder Teile Südosteuropas beschränkt (BANETH et al., 2014), diese bisher nur in Indien und Afrika vorkommen (HASSAN et al., 2009; ALAM et al., 2013; AKTER et al., 2016) oder ausschließlich auf dem amerikanischen Kontinent beheimatet sind, so wie *L. mexicana* oder *L. braziliensis*. Gerade einmal fünf Studienhunde stammten aus Gebieten außerhalb Europas (Thailand, Türkei, Russland, Burma, Vereinigte Staaten von Amerika) oder hatten sich im Laufe ihres Lebens dort aufgehalten. Die restlichen Hunde hatten jedoch allesamt ihr gesamtes bisheriges Leben in Europa verbracht. Daher erscheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit, mit der die niedrige Sensitivität der PCRun erklärt werden könnte, ist die Annahme, dass die Referenz-PCR falsch-positive Ergebnisse hervorbrachte. Das hierfür genutzte PCR-Protokoll mit *Leishmania*-spp.-spezifischen Mononukleotid-Primern ist jedoch validiert, wurde in vorangegangenen Studien genutzt und stellte sich bis dato immer als verlässlich heraus (FRANCINO et al., 2006; GEISWEID et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2017). In der Studie von FRANCINO et al. aus dem Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass die Referenz-PCR bei mindestens 30 Parasiten/ml Probe (getestet wurden Blut und Knochenmark) positiv ausfiel. Darüber hinaus wurde im Jahr 2013 in der Studie von GEISWEID et al. das identische PCR-Protokoll wie in der aktuellen Studie verwendet. Das Protokoll wurde mit den gleichen Geweben, nämlich Vollblut, Knochenmarkaspiraten, Lymphknotenaspiraten und

Konjunktivaltupfern, durchgeführt und positive Ergebnisse wurden jeweils durch Gelelektrophorese verifiziert. Aus diesen Gründen wurde dieses PCR-Protokoll als Referenz-PCR gewählt. Eine Gelelektrophorese wurde auch in der vorliegenden Studie bei sechs Proben, für die die Ergebnisse der PCRRun und der Referenz-PCR nicht übereinstimmten, sowie für vier Proben mit übereinstimmenden Ergebnissen durchgeführt und verifizierte in jedem Fall das Ergebnis der Referenz-PCR. Auch die Sequenzierung einer in der PCRRun negativen und in der Referenz-PCR positiven Probe zeigte, dass es sich um *Leishmania*-spp.-DNA handelte, die jedoch leider nicht genauer differenziert werden konnte.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die niedrige Sensitivität der PCRRun auch mit der Menge an isolierter DNA korreliert sein könnte. Es kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass in jeder Referenz-PCR-positiven Probe eine große Menge an isolierter DNA vorhanden war. Es ist möglich, dass die Referenz-PCR trotz einer geringen Menge an isolierter DNA positive Ergebnisse hervorbrachte, während die PCRRun hierzu nicht in der Lage war. Dieser Verdacht erhärtete sich, da in beprobten Geweben, von denen auszugehen ist, dass sie beim Vorliegen einer Infektion größere Mengen an Erreger-DNA enthalten, z. B. Knochenmark (MAIA & CAMPINO, 2008) und Lymphknoten (MANNA et al., 2004; MAIA et al., 2009; RAMOS et al., 2013), die Infektion mit der PCRRun zumeist nachgewiesen werden konnte. Hingegen erkannte die PCRRun in Geweben mit einer zu erwartenden niedrigeren Erregerlast, wie z. B. Blut (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012), nur zehn Prozent der Infektionen. Eine Studie aus dem Jahr 2014 (WANER et al., 2014), welche ebenfalls eine PCRRun, in diesem Fall zum Nachweis von *Ehrlichia-canis*- (*E.-canis*-) DNA, durchführte, zeigte sehr ähnliche Ergebnisse. In dieser Studie wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion von Hunden Blut mittels PCRRun untersucht. Zum Zeitpunkt der akuten Phase der Infektion, in der davon auszugehen ist, dass bei akuter Bakteriämie die Menge an *E.-canis*-DNA im peripher entnommenen Blut hoch ist, wies die PCRRun eine Sensitivität von 75,0 % auf. Zu früheren und späteren Zeitpunkten konnte keiner der experimentell infizierten Hunde mittels der PCRRun identifiziert werden. Über die gesamte Studiendauer betrug die Sensitivität der PCRRun 30,0 %. Die Spezifität war genauso wie in der aktuellen Studie mit 100 % exzellent. Somit bestätigt auch die Studie von WANER et al. aus dem Jahr 2014

die Vermutung, dass die niedrige Sensitivität der PCR mit einer geringen Menge an isolierter DNA korreliert sein könnte.

Anhand der vorliegenden Literatur können keine allgemeingültigen Aussagen bezüglich PCR-Schnelltests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund getroffen werden. Trotz der Tatsache, dass es bislang keine „geschlossenen in-house-PCR-Systeme“ gibt, und somit die Spezifität der Methode ständig von äußerer Kontamination beeinflussbar ist, weist diese in der Regel hohe Werte auf (90,8 % (ANDREADOU et al., 2012); 80,0 % (CHAOUCH et al., 2013)). Die Sensitivitäten sind deutlich variabler, jedoch in der Regel mit Werten zwischen 43,0 % (ANDREADOU et al., 2012) und 54,0 % (CHAOUCH et al., 2013) deutlich niedriger als herkömmliche PCR (Tabelle 9).

Es muss angemerkt werden, dass die vorliegende Studie auch einige Limitationen aufweist. Zum einen konnten nicht alle Gewebeproben bei allen an der Studie teilnehmenden Hunden gewonnen werden. Dies lag hauptsächlich daran, dass die Hundebesitzer invasiveren Gewebeprobennahmen, so wie beispielsweise Knochenmarkspunktionen, eher restriktiv gegenüberstanden. So konnte von den insgesamt 251 an der Studie teilnehmenden Hunden lediglich von 51 Hunden Knochenmarksaspirate und von 19 Hunden Lymphknotenaspirate entnommen werden, wohingegen bei 201 Hunden Blutproben und bei 244 Hunden Konjunktivalabstriche gewonnen werden konnten. Zum anderen wurden keine anderen Infektionserreger, wie zum Beispiel *Trypanosoma (T.)* spp., die potenziell eine Kreuzreaktivität mit *Leishmania* spp. hervorrufen könnten, mitgetestet. Die Studie von DANTAS-TORRES et al. aus dem Jahr 2017, in der die identischen Primer wie in der aktuellen Studie gewählt wurden, zeigte jedoch, dass die Primer zwar nicht in der Lage sind, zwischen einzelnen *Leishmania* spp. zu unterscheiden, jedoch auch keine Kreuzreaktivität durch *T. cruzi* nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigt, dass die Primer *Leishmania*-spp.-spezifisch sind.

Zudem gibt es bislang keine Daten zur Prävalenz der Leishmaniose beim Hund in Deutschland. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der positiven und negativen prädiktiven Werte die zufällige Prävalenz der Infektion in der Studienpopulation herangezogen. Dies entspricht vermutlich nicht der realen Prävalenz in einem nicht-endemischen Gebiet, wie Deutschland, sondern eher der Situation in einer endemischen Region. Jedoch sind die Prävalenzen der kaninen Leishmaniose in endemischen Gebieten sehr unterschiedlich und können selbst

von Region zu Region innerhalb eines endemischen Landes stark variieren (SIDERIS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001a; FERROGLIO et al., 2005; CANAKCI et al., 2016). Leider konnte die PCR<sub>run</sub> im Rahmen dieser Studie auch nicht direkt mit anderen Schnelltests, z. B. zum Antikörpernachweis, welche derzeit zur Leishmaniosediagnostik einen nicht zu verachtenden Stellenwert einnehmen, verglichen werden. In Anbetracht der Ergebnisse von Sensitivität und Spezifität bei Schnelltests zum Antikörpernachweis (SOLANO-GALLEGO et al., 2014) zeigte sich jedoch, dass die PCR<sub>run</sub> zwar in der Spezifität mindestens gleichwertig ist, jedoch in der Sensitivität nicht konkurrieren kann. Die in der Studie von SOLANO-GALLEGO et al. aus dem Jahr 2014 getesteten Antikörper-Schnelltests wiesen Sensitivitäten zwischen 63,6 % (Speed Leish K<sup>®</sup>) und 95,3 % (ID Screen<sup>®</sup>) auf. Daher wäre es wünschenswert, Folgestudien mit Feldproben durchzuführen, die die Antikörper-nachweisenden Schnelltests mit dem PCR-Schnelltest aus dieser Studie unter gleichen Voraussetzungen vergleichen. Ebenso wäre auch ein Vergleich verschiedener PCR-Schnelltests auf der Basis von identischen Proben sehr wünschenswert.

Letztendlich ist die PCR<sub>run</sub> auch durch die hohen Anforderungen, die an die durchführende Einrichtung und die durchführenden Personen gestellt werden, limitiert. Die DNA-Isolierung, die der Testdurchführung vorangehen muss, stellt gewisse Anforderungen an vorhandene Laborausstattung sowie an Kenntnisse und Schulung von Personal. Um ein möglichst geringes Risiko von DNA-Kontaminationen einzugehen, sollten Standard Operating Procedures (SOP) und Qualitätskontrollen geschaffen werden, die dafür sorgen, dass die Testdurchführung standardisiert unter optimalen Bedingungen durchgeführt wird. Sowohl Arbeitsabläufe, technische Voraussetzungen sowie die Ausbildung der Labormitarbeiter müssen dahingehend optimiert sein, um verlässliche Testresultate zu erhalten.

Da es für die Diagnose der Leishmaniose beim Hund keinen „Goldstandard“ gibt, mit dem eine Sensitivität sowie Spezifität von 100 % erreicht werden kann, ist es schwierig, geeignete Methoden zu finden, die für neue Tests als Referenz herangezogen werden können (SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Häufig werden deshalb auch Kombinationen aus zwei und mehr Tests gewählt, um für Studien einen diagnostischen „Goldstandard“ beziehungsweise eine Referenzmethode darstellen zu können (SCHALLIG et al., 2004; SOUSA et al., 2011). Auf der Suche

nach einem schnell durchführbaren, sehr sensitiven und spezifischen Test konnte die PCRun hier leider auch nicht diese diagnostische Lücke schließen, da es ihr, ebenso wie vielen der kommerziellen Antikörper- und PCR-Schnelltests, an ausreichender Sensitivität fehlt.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Doktorarbeit. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Sensitivität und Spezifität eines PCR-Schnelltests (PCRun) zu bestimmen und Aussagen über die Funktionalität und Brauchbarkeit dieses Schnelltests im klinischen Alltag zu treffen.

Hierzu wurden insgesamt 515 Gewebeproben, darunter Vollblut, Konjunktivaltupfer, Lymphknotenaspirate und Knochenmarksaspirate von 251 Hunden sowohl mittels Referenz-PCR, als auch mit der PCRun, einer In-Clinic-Point-of-Care- (ICPOC-) PCR, untersucht, und die Ergebnisse miteinander verglichen. Bei den Hunden, die für diese Studie herangezogen wurden, handelte es sich um Patienten, die entweder im Rahmen einer Leishmanioseabklärung mit begründetem Verdacht oder aus anderen Gründen, wie zum Beispiel zur Gesundheitsvorsorge, an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorstellig wurden. Die meisten dieser Hunde hatten keinen Auslandsvorbericht oder andere Hinweise auf eine Leishmaniose. Weitere Einschluss- oder Ausschlusskriterien wurden nicht festgelegt. Definitionsgemäß galten Hunde, die in der Referenz-PCR für Vollblut und/oder Konjunktivaltupfer und/oder Lymphknotenaspirat und/oder Knochenmarksaspirat positiv waren, als infiziert mit *Leishmania* spp. Hunde, die sowohl in Vollblut als auch in Konjunktivaltupfern, Lymphknotenaspiraten und Knochenmarksaspiraten negative Ergebnisse in der Referenz-PCR hatten, galten als nicht infiziert. Die Berechnungen von Sensitivität und Spezifität der PCRun wurden durch Vergleich mit dem diagnostischen „Goldstandard“ dieser Studie, nämlich der Referenz-PCR, durchgeführt.

Die Spezifität der PCRun erwies sich als exzellent, da bei allen 515 Proben keine falsch positiven Ergebnisse zu verzeichnen waren. Dies resultierte in einer Spezifität von 100 %. Im Gegensatz dazu erwies sich die Sensitivität der ICPOC-PCR als deutlich weniger überzeugend. Abhängig vom untersuchten Gewebe ergaben sich hier Sensitivitäten von nur 10,0 % bei Vollblut bis hin zu 58,8 % bei Lymphknotenaspiraten. In Geweben, in denen in der Regel nur wenig *Leishmania*-spp.-DNA bei infizierten Tieren vorhanden ist (Vollblut), wies die ICPOC-PCR deutlich geringere Sensitivitäten auf, als in Geweben, in denen die Erregerlast nachgewiesenermaßen deutlich höher ist (Konjunktiven, Lymphknoten, Knochenmark).

Die PCRun konnte durch hohe Spezifität überzeugen. Es sind keine falsch positiven Ergebnisse zu erwarten und somit können positive Testresultate mit einer Infektion durch *Leishmania* spp. gleichgesetzt werden. Darüber hinaus erwies sich die Testdurchführung nach vorangegangener DNA-Extraktion als sehr praktikabel und einfach durchführbar. Die Studie konnte jedoch belegen, dass die ICPOC-PCR eine hohe Anzahl an infizierten Hunden nicht identifiziert. Damit kann die Sensitivität dieses PCR-Schnelltests im Moment noch nicht mit den Sensitivitäten der antikörperbasierten Schnelltests, die momentan noch den Markt beherrschen, mithalten, und erwies sich, wie auch andere PCR-Schnelltests zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund, als wenig sensitiv.



## VI. SUMMARY

The aim of this cumulative doctoral thesis was to evaluate sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care (ICPOC) PCR and to determine its practicability and usefulness under clinical conditions.

In this context, 515 clinical samples, consisting of blood samples, conjunctival swabs, lymph node aspirates, and bone marrow aspirates of 251 dogs were tested both with the reference PCR and PCRRun (ICPOC PCR), and test results were compared. The participants of this study were dogs that were patients at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, presented for diagnostics related to possible *Leishmania* spp. infections or healthy dogs without the suspicion of *Leishmania* spp. infections or origin from an endemic country, that were presented for health care consultations, for example. There were no further in- or exclusion criteria for selection of participating dogs. Dogs that were positive in the reference PCR in blood and/or conjunctival swab and/or lymph node aspirate and/or bone marrow aspirate were defined to be infected with *Leishmania* spp. Dogs negative in blood, conjunctival swab, lymph node aspirate, and bone marrow aspirate in the reference PCR were defined as not infected. Results of the reference-PCR in each tissue were defined to be the golden standard to which PCRRun results were compared.

Specificity of PCRRun was excellent. There were no false positive results. This resulted in 100% specificity. In contrast, however, the sensitivity of this ICPOC PCR was relatively low. Depending on tissue origin, PCRRun demonstrated sensitivities between 10.0% for blood samples and 58.8% for lymph node aspirates. Tissues with an expected low *Leishmania* spp. DNA load (blood) showed significantly lower sensitivities than tissues with an expected higher load of *Leishmania* spp. (conjunctiva, lymph node, bone marrow).

In conclusion, with the intention to create a fast, practicable and reliable ICPOC-PCR testing method, based on the direct detection of the pathogen, PCRRun was able to convince by its excellent specificity and practicability. Positive results therefore indicate *Leishmania* spp. infections. However, this study shows that this ICPOC PCR misses a relatively high number of infected dogs, and therefore the sensitivity of PCRRun cannot compete with sensitivities of antibody-based rapid tests for the

---

diagnosis of canine leishmaniasis. Like other PCR rapid tests for the detection of canine leishmaniasis, PCRun is not very sensitive.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991; 13: 537-550.

Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1946.

Adel A, Berkvens D, Abatih E, Soukehal A, Bianchini J, Saegerman C. Evaluation of immunofluorescence antibody test used for the diagnosis of canine leishmaniasis in the Mediterranean basin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0161051.

Akter S, Alam MZ, Nakao R, Yasin G, Kato H, Katakura K. Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral Leishmaniasis-endemic areas of Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95: 795-799.

Akuffo H, Maasho K, Bløstedt M, Hojeberg B, Britton S, Bakhiat M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-gamma. *J Infect Dis* 1997; 175: 737-741.

Alam MZ, Yasin G, Kato H, Sakurai T, Katakura K. PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral Leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 75-78.

Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 306-307.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57: 1-88.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7: e35671.

Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of Leishmania infantum in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. Ann N Y Acad Sci 2004; 1026: 154-157.

Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O. Leishmania (Leishmania) chagasi is not vertically transmitted in dogs. Vet Parasitol 2002; 103: 71-81.

Andreadou M, Liandris E, Kasampalidis IN, Taka S, Antoniou M, Ntais P, Vaiopoulou A, Theodoropoulos G, Gazouli M, Ikononopoulos J. Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of Leishmania DNA in canine clinical samples. Exp Parasitol 2012; 131: 419-424.

Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. Acta Trop 1996; 62: 45-56.

Arruda MM, Figueiredo FB, Marcelino AP, Barbosa JR, Werneck GL, Noronha EF, Romero GA. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine Leishmania infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016; 111: 168-173.

Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, dos Santos JC, Oliveira GG, Nascimento EG, de Carvalho LP, dos-Santos WL. Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. Vet Parasitol 2006; 139: 21-28.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Vet J 2008; 175: 14-15.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 2008; 24: 324-330.

Baneth G, Nachum-Biala Y, Shabat Simon M, Brenner O, Gaier S, Rojas A, Yasur-Landau D. *Leishmania major* infection in a dog with cutaneous manifestations. *Parasit Vectors* 2016; 9: 246.

Baneth G, Yasur-Landau D, Gilad M, Nachum-Biala Y. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasit Vectors* 2017; 10: 113.

Baneth G, Zivotofsky D, Nachum-Biala Y, Yasur-Landau D, Botero AM. Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasit Vectors* 2014; 7: 118.

Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006; 28: 329-337.

Barbosa W, Pinheiro Z, Oliveira R. Elektroimmunodiffusão no diagnóstico do calazar com os antígenos de *Leishmania donovani*, *Leishmania brasiliensis* e “*Leptomonas pessoai*” – Resultados preliminares. *Rev Pathol Trop* 1973; 4: 377-386.

Basiye FL, Mbuchi M, Magiri C, Kirigi G, Deborggraeve S, Schoone GJ, Saad AA, El-Safi S, Matovu E, Wasunna MK. Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Trop Med Int Health* 2010; 15: 806-810.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e313.

Bernadina WE, De Luna R, Oliva G, Ciaramella P. An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 1997; 73: 207-213.

Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 353-356.

Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008, 31: 527-536.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997a; 59: 21-30.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest* 1997b; 9: 439-440.

Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 1992; 14: 531-539.

Canakci T, Kurtdele A, Pasa S, Toz Ozensoy S, Ozbel Y. Seroprevalence of canine Leishmaniasis in northern Cyprus. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2016; 40: 117-120.

Carcelen J, Iniesta V, Fernandez-Cotrino J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I, Gallardo-Soler A, Maranon F, Soto M, Alonso C, Gomez-Nieto C. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* 2009; 27: 5964-5973.

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 1998; 79: 213-220.

Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O. Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with conventional and real-time

PCR for Diagnosis of canine Leishmania infection. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3325-3330.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 1994; 56: 315-325.

Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 289-295.

Chamaille L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors* 2010; 3: 31.

Chaouch M, Mhadhbi M, Adams ER, Schoone GJ, Limam S, Gharbi Z, Darghouth MA, Guizani I, BenAbderrazak S. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. *Vet Parasitol* 2013; 198: 78-84.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997; 141: 539-543.

Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66: 603-610.

Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 12-17.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous

leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 1986; 89: 319-323.

Couppie P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 558-560.

Da Costa RT, Franca JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 678-682.

Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 1989; 143: 617-622.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 139-146.

Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probes* 2017; 31: 65-69.

De Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1596.

De Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araujo MS, Vianna LR, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 85-97.



Di Muccio T, Veronesi F, Antognoni MT, Onofri A, Piergili Fioretti D, Gramiccia M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2651-2659.

Espinosa D, Boggild AK, Deborggraeve S, Laurent T, Valencia C, Pacheco R, Miranda-Verastegui C, Llanos-Cuentas A, Leclipteux T, Dujardin JC, Buscher P, Arevalo J. *Leishmania* OligoC-TesT as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2560-2563.

Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodriguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107: 163-169.

Fernandez-Perez FJ, Gomez-Munoz MT, Mendez S, Alunda JM. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop* 2003; 86: 83-91.

Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146: 235-241.

Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 152: 257-263.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 2007; 144: 162-166.

Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1618-1620.

Ferroglio E, Vitale F. Diagnosis of leishaniosis: between old doubts and new uncertainties. *Vet Res Commun* 2006; 30: 35-38.

Ferroglio E, Zanet S, Mignone W, Poggi M, Trisciuoglio A, Bianciardi P. Evaluation of a rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as an alternative to immunofluorescence assay and Western blotting. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20: 657-659.

Fisa R, Gallego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, de Colmenares M, Castillejo S, Portus M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 50-55.

Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 2001; 99: 105-111.

Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun* 2007; 31: 335-341.

Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006; 137: 214-221.

Geisweid K, Weber K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Vet J* 2013; 198: 187-192.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 2008; 175: 45-52.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1169-1180.

Grimaldi G Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 687-725.

Guessous-Indrissi N, Chiheb S, Hamdani A, Riyad M, Bichichi M, Hamdani S, Krimech A. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 660-663.

Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health* 2016; 44: 2.

Hashiguchi Y, Velez LN, Villegas NV, Mimori T, Gomez EA, Kato H. Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta Trop* 2017; 166: 299-315.

Hassan MM, Osman OF, El-Raba'a FM, Schallig HD, Elnaiem DE. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasit Vectors* 2009; 2: 26.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-1199.

Ker HG, Coura-Vital W, Aguiar-Soares RD, Roatt BM, das Dores Moreira N, Carneiro CM, Machado EM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Giunchetti RC, Araujo MS, Coelho EA, da Silveira-Lemos D, Reis AB. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20: 1792-1798.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Detet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002a; 125: 197-207.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002b; 40: 210-215.

Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 2010; 170: 201-206.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 2002; 109: 19-27.

Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 312-317.

Magill AJ, Grogl M, Gasser RA Jr., Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* 1993; 328: 1383-1387.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008; 158: 274-287.

Maia C, Cardoso L. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Parasitol* 2015; 213: 2-11.

Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2009; 179: 142-144.

Mancianti F, Meciani N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1409-1411.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004; 125: 251-262.

Marcondes M, Bionda AW, Gomes AA, Silva AR, Vieira AF, Camacho AA, Quinn J, Chandrashekar R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet. Parasitol* 2011; 175:15-19.

Marcondes M, de Lima VM, de Araujo Mde F, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RF, Biondo AW. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®; *Vet Parasitol* 2013; 197: 649-652.

Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 2008; 13: 256-264.

Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA 21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res* 2014; 45: 69.

Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 2010; 3: 34.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005a; 43: 5515-5519.

Mettler M, Grimm F, Naucke TJ, Maasjost C, Deplazes P. Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2005b; 118: 37-44.

Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 2008, 24: 371-377.

Mohebbali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 Test and direct agglutination. *Vet Parasitol* 2004; 121: 239-245.

Mondal D, Ghosh P, Khan MA, Hossain F, Bohlken-Fascher S, Matlashewski G, Kroeger A, Olliaro P, Abd El Wahed A. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit Vectors* 2016; 9: 281.

Morales G, Carrillo G, Requena J, Guzman F, Gomez L, Patarroyo M, Alonso C. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 1997; 114: 507-516.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007; 145: 245-252.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18: 399-405.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alvar J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 181-195.

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Guegen S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1683.

Moreno J, Vouldoukis I, Schreiber P, Martin V, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 158: 199-207.

Neogy A, Vouldoukis J, Silva O, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, Rzepka D, Monjour L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 772-777.

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1666-1669.

Nieto C, Garcia-Alonso M, Requena J, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67: 117-130.

Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005; 16: 213-232.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: e63.

Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 49-52.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E: Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236:1184-1191.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1-13.

Pilatti MM, Ferreira Sde A, de Melo MN, de Andrade AS. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci* 2009; 87: 255-257.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62: 229-235.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 544-548.

Pourquier P, Lesceu S, Dereure J, Keck N. Validation of a new commercial ELISA kit for the detection of directed against *Leishmania infantum* in canine sera. In *Proceedings of 13<sup>th</sup> World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*: 11-14 of November 2007. Melbourne, Australia; 2007.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 2001; 122: 253-261.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91: 161-168.

Ramos RA, Ramos CA, Santos EM, de Araujo FR, de Carvalho GA, Faustino MA, Alves LC. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22: 346-350.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 147-154.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2352-2356.



Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against Leishmania antigens in dogs naturally and experimentally infected with Leishmania infantum. Vet Parasitol 1999; 81: 173-184.

Ribeiro RA, Teixeira-Neto RG, Belo VS, Ferreira EC, Schallig HD, Silva ES. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with Leishmania infantum and Leishmune<sup>®</sup>-vaccinated dogs. Vet Res Commun 2015; 39: 87-95.

Rocha RD, Gontijo CM, Eloi-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Correa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anti-live Leishmania (viannia) braziliensis promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35: 551-562.

Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Altet L, Solano-Gallego L, Sanchez-Robert E, Francino O, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. Int J Parasitol 2007; 37: 683-693.

Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Todoli F, Alberola J. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect Leishmania infantum infection on experimentally infected dogs. Vet Parasitol 2013; 191: 363-366.

Rolao N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of Leishmania infantum parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. J Parasitol 2004; 90: 1150-1154.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, Gradoni L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant Leishmania antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 1153-1156.

Rosypal AC, Troy GC, Duncan RB, Zajac AM, Lindsay DS. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North

American isolate of *Leishmania infantum infantum*. J Vet Inter Med 2005; 19: 802-809.

Roura X, Sanchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. Vet Rec 1999; 144: 262-264.

Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, Buscher P, Schoone GJ, Schallig HD, Laurent T, Haleem A, Osman OF, Eltom AM, Elbashir MI, El-Safi S. Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-Test and NASBA-Oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e776.

Santarem N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. J Clin Microbiol 2010; 48: 1866-1874.

Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 51-55.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. Am J Trop Med Hyg 2005; 73: 82-86.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol 2002; 104: 275-285.

Schallig HD, Cardoso L, Hommers M, Kroon C, Belling G, Ridgrigues M, Semiao-Santos SJ, Vetter H. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. J Clin Microbiol 2004; 42: 193-197.

Schallig HD, Schoone GJ, Beijer EG, Kroon CC, Hommers M, Özbel Y, Özensoy S, da Silva ES, Cardoso LM, da Silva ED. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. *Vet Parasitol* 2002; 109: 1-8.

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R, Braga RR, Silveira FT. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Pova, Ishikawa & Silveira, in Para State, Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 1991; 66: 243-246.

Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* 2009; 163: 281-285.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 271-276.

Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am Trop Med Hyg* 2001; 65: 896-898.

Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 2006; 30: 637-643.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009; 165: 1-18.

Solano-Gallego L, Llull J, Arboix M, Ferrer L, Alberola J. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 2001c; 102: 163-166.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramis A, Fernandez-Bellon H, Rodriguez A, Ferrer L, Alberola J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 815-818.

Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2011; 4: 86.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001a, 39: 560-563.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portus M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 2001b; 96: 265-276.

Solano-Gallego L, Tabar MD, Horno F, Ordeix L. A descriptive study of clinical canine leishmaniosis in dogs vaccinated with CaniLeish. *J Vet Intern Med* 2017; 31: 238-239.

Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasit Vectors* 2014; 7: 111.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 58-63.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Angel SO, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol* 1995a. 100: 246-252.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 1995b. 48: 23-28.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Gurman F, Patarroyo ME, Alonso C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscero-cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 342-349.

Sousa S, Cardoso L, Reed SG, Reis AB, Martins-Filho OA, Silvestre R, Cordeiro da Silva A. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2371.

Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, Cordeiro da Silva A. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop* 2011; 120: 82-87.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004; 189: 1729-1733.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; 240: 1285-1293.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004; 292: 17-23.

Tuon FF, Neto VA, Amato VS. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 158-166.

Van Griensven J, Gadisa E, Aseffa A, Hailu A, Beshah AM, Diro E. Treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004495.

Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, Gam AA, Neva FA. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 280-288.

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026: 139-143.

Waner T, Nachum-Biala Y, Harrus S. Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *Vet J* 2014; 202: 618-621.

Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2006; 2: 17.

Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol* 1999; 81:11-19.

## VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei meiner Doktormutter, **Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann**, bedanken, die mich sehr unterstützt und an mich geglaubt hat. Durch sie wurde es mir ermöglicht, eine klinische Doktorarbeit auf einem überaus spannenden Themengebiet der inneren Medizin anzufertigen. Erst durch meine Doktorarbeit habe ich mich mit dem Bereich der Infektionsmedizin, insbesondere natürlich der Leishmaniose beim Hund, intensiv auseinandergesetzt und dieses Themengebiet sehr zu schätzen gelernt. Vieles muss in der Infektiologie noch weiter erforscht werden und gerade bei der Leishmaniose-Diagnostik ist man mit Sicherheit noch nicht am Ende der diagnostischen Möglichkeiten angelangt.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei **Frau Priv.-Doz. Dr. Karin Weber** für die große Unterstützung und Hilfeleistung bei der Probenisolierung, der Durchführung der Referenz- und ICPOC PCR, sowie für zusätzliche konstruktive Vorschläge und Einwände, bedanken.

Ebenso möchte ich mich auch bei **Frau Dr. Michèle Bergmann** und **Frau Dr. Kathrin Geisweid** herzlich bedanken, die mir fachlich jederzeit zur Seite gestanden haben und mich bei der Probensammlung unterstützten.

Großen Dank auch an meine **Freunde und Kollegen** an der **Medizinischen Kleintierklinik**, die mich bei der Probensammlung ebenfalls grandios unterstützt haben.

Last but not least möchte ich mich insbesondere von ganzem Herzen bei **meinen Eltern**, die es mir ermöglichen haben, das Studium der Tiermedizin sowie die Anfertigung der Doktorarbeit durchführen zu können, bedanken. Ohne meine Eltern hätte ich mir diesen Traum niemals verwirklichen können.